

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Fisiología Animal



TESIS DOCTORAL

**Acción de la brandicinina y de los inhibidores de la fosfodiesterasa 4 en
la fisiología de la micción**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Sofía Fernandes Ribeiro

Directores

Medardo Vicente Hernández Rodríguez
Albino García Sacristán

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



ACCIÓN DE LA BRADICININA Y DE LOS
INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA 4
EN LA FISIOLÓGÍA DE LA MICCIÓN

TESIS DOCTORAL

ANA SOFIA FERNANDES RIBEIRO

MADRID, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Los doctores Medardo Vicente Hernández Rodríguez y Albino García Sacristán, Profesor Titular y Catedrático, respectivamente, de la Sección Departamental Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D^a Ana Sofia Fernandes Ribeiro, Licenciada en Enfermería y Máster en Ciencias Farmacéuticas, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado “Acción de la bradicinina y de los inhibidores de la fosfodiesterasa 4 en la fisiología de la micción” como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 1 Septiembre de 2014

Prof. Dr. Medardo V. Hernández Rodríguez

Prof. Dr. Albino García Sacristán

A mis padres, mi hermano y Vítor,

“Cuanto mayor es la dificultad, mayor es la gloria.”

Marco Tulio Cicerón

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de los años que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral, numerosas personas me han acompañado y facilitado su apoyo, consejo y ánimo, sin las cuales no hubiera sido posible lograr este objetivo. Y este es el momento de expresarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar agradecer a mi director de tesis, el Dr. Medardo Vicente Hernández Rodríguez, no solo por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, sino también por el tiempo que me ha dedicado durante estos años, y sobre todo por animarme y apoyarme en los momentos “menos buenos”, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por compartir esa “pasión” por el mundo de la investigación científica, ¡que tanto te caracteriza!!!

Al Profesor Albino García Sacristán, codirector de esta Tesis, por la excelente acogida en el Departamento de Fisiología y por sus consejos, apoyo y asesoramiento científico. Muchas gracias por brindarme la oportunidad de pertenecer a este equipo magnífico y tan brillante.

Me gustaría también agradecer a la Dras. Paz Recio y Belén Climent por enseñarme, ayudarme, escucharme, aconsejarme... Vuestras palabras de apoyo y cariño me han ayudado muchísimo...

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Ana Sánchez, por su simpatía y palabras de amistad. ¡Los “cafetitos” a media mañana que jamás olvidaré!!! ¡Hemos compartido mucho a lo largo de estos años! ¡Muchas gracias de todo corazón, por estar siempre presente!

A la Dra. María Pilar Martínez del Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de la UCM por su gran trabajo inmunohistoquímico. Gracias por su colaboración y por estar siempre tan dispuesta.

A la Dra. Elvira López-Oliva, por su colaboración con la técnica del Western Blotting, sus enseñanzas y estar siempre tan dispuesta a ayudar.

A la Dra. María Ruth Pazos Rodríguez de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, por su disponibilidad y colaboración con la técnica del Western Blotting.

A los profesores del Departamento de Fisiología, por facilitarme la integración en el Departamento y hacerme sentir una compañera más durante estos años de desarrollo de mi tesis, y no quisiera olvidarme de ninguno de vosotros. Gracias a los profesores Dolores Prieto, Luis Rivera, Sara Benedito, Cristina Martínez, Ángel Agis y Rafaela Raposo.

A las Dras. Cristina Contreras (Cris), Ana Martínez-Sáenz (Aniuska), muchas gracias chicas por todos los momentos maravillosos compartidos, ¡esas quedadas de Fisio inolvidables!!! Y como no a los doctorandos Merche, Igor y Elvira, gracias por escucharme, por la compañía en días largos de experimentos y sobre todo por ayudarme en todo lo que les ha sido posible. Os deseo mucha suerte en vuestras tesis. ¿Quién será el próximo? ¿Merche? ¿Elvira?

A Macarena Martín, Francisco Puente y Manuel Perales. Maca, sin duda eres la mejor secretaria del mundo, mucho hemos compartido a lo largo de estos años, ¡muchas gracias por esa sonrisa contagiante y ayudarme en todo! ¡Eres muy “grande”!!! Paquito y Manolo, excelentes técnicos, sin vuestra ayuda todo sería mucho más difícil. Gracias por hacer el laboratorio tan divertido y alegre. Estais los tres en mi corazón, ¡sois los mejores!!!

Al Dr. Luis Orensanz del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, por sus enseñanzas, consejos y estar siempre tan dispuesto a ayudar.

Al Dr. Salvador Bustamante, por compartir su pasión por la investigación, por sus consejos y experiencia profesional.

A todos mis amigos y amigas, por estar siempre ahí, escuchándome, apoyándome y diciéndome: “¡No queda nada, ya lo tienes!”. A mis “portus”: Claudia, Ángela, Vania, Lopes, David. A “Los listos Avispaos” forever (Lidi, Bea, Toño, la peque Daniela, José, Nerea, Viole, Angela, David, Ricardo, Andrés). A los compis de trabajo de la Fundación Instituto San José, gracias por todo el apoyo y sobre todo por los cambios de turno que me habeis hecho para que pudiera acudir al laboratorio. A los doctorandos Toño y Alex, os deseo muchísima suerte, podeis contar conmigo para lo que necesiteis.

A los supervisores de enfermería Javi y Toño, por sus ánimos y sobre todo por mostrar siempre su comprensión con los “miles” de cambios de turno en mi planilla de trabajo mensual.

Por supuesto, me gustaría dar un millón de gracias a mi familia, (a la que tengo que escribir en portugués):

“Papá, mamã, obrigado por tudo o que fizestes por mim, tudo o que me ensinastes! Sou o fruto do vosso trabalho! Obrigado por todo o orgulho que sentis por mim, fico muito feliz por isso! Adoro-vos.” “Maninho, aprendi muito contigo! Sempre foste a minha referência! Obrigado pelos teus conselhos e por estar sempre presente. Obrigado cunhada, pelas tuas palavras de apoio e por dar-me uns sobrinhos lindos!” “Prima Carla, obrigado por te sentires sempre tão orgulhosa da tua comadre, pelas tuas palavras de carinho e por ser uma tradutora super eficiente que me ajudou com alguns resumos em inglês.” “Aos meus avós, sempre tão carinhosos.”. Obrigado Família!

Y por último, quisiera dedicar esta tesis a mi “persona especial”, Vitor. Sin ti, no hubiera podido llegar hasta aquí. Si no fuera por tu estímulo e insistencia, ni siquiera me hubiera matriculado en el máster para embarcar en esta aventura juntos! Gracias por ser mi compañero de batalla en las buenas y las malas, por compartir las sonrisas y las lágrimas, sobre todo por tu paciencia y amor incondicional. Desde que empezamos en el mundo de la investigación, siempre me has ayudado en lo que has podido. Este año fue diferente, bastante más difícil por tu ausencia. Pero, a pesar de miles de kilómetros de separación física, has estado ayudándome, apoyándome, alentándome para seguir adelante. Por ello digo y repito: Esta tesis es tanto tuya como mía. Gracias por ser parte de mi vida. AMT MTO!!!

Este trabajo de investigación ha sido financiado gracias a los Proyectos PS09/00044 del Ministerio de Ciencia e Innovación y PR6/13-18858 de la Universidad Complutense de Madrid (Santander-UCM), cuyo investigador principal es el Dr. Medardo Vicente Hernández Rodríguez.

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AmM	Enzima aminopeptidasa M
AmP	Enzima aminopeptidasa P
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANG II	Angiotensina II
APSC	Aferentes primarias sensibles a capsaicina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BK	Bradicinina
Ca ²⁺	Ión calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
CBS	Enzima cistationina β-sintasa
CEPM	Plasma cininógeno de alto peso molecular
CEPR	Plasma cininógeno de bajo peso molecular
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CIC	Células Intersticiales de Cajal
C-kit	Receptor tirosina-cinasa
Cl ⁻	Ión cloro
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CPN	Enzima carboxipeptidasa N plasmática
CPM	Enzima carboxipeptidasa M unida a membrana
CSE	Enzima cistationina γ-liasa
DAG	Diacilglicerol
EPN	Enzima endopeptidasa neutra
ET	Endotelina
G _i	Subunidad inhibidora de las proteínas G
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico

GTP	Guanosina trifosfato
5-HT	Serotonina
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
H ₂ S	Sulfuro de Hidrógeno
ICS	Sociedad Internacional de Continencia
IUE	Incontinencia Urinaria de estrés
IUU	Incontinencia Urinaria de urgencia
IK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
IL-1	Interleucina-1
IP ₃	Inositol trifosfato
IP ₃ IR	Receptores de inositol trifosfato
IU	Incontinencia Urinaria
K ⁺	Ión potasio
K _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio
K _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
K _v	Canales de potasio dependientes de voltaje
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MLC	Cadena ligera reguladora de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLC-P	Cadena ligera reguladora de miosina fosforilada
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Ión sodio
NANC	No adrenérgico no colinérgico
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico
NOS _e	Enzima de síntesis de óxido nítrico endotelial
NOS _i	Enzima de síntesis de óxido nítrico inducible
NOS _n	Enzima de síntesis de óxido nítrico neuronal
NPY	Neuropéptido Y
PAC ₁	Receptor específico de PACAP
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario

PDEs	Fosfodiesterasas
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGs	Prostaglandinas
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente del AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PLC	Fosfolipasa C
Rho	Cinasa específica
Rhok	Rho-cinasa asociada
ROC	Canales de calcio activados por receptor
RS	Retículo sarcoplásmico
RVU	Reflujo Vésicoureteral
RyR	Receptor de rianodina
SK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de baja conductancia
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOC	Canales de calcio operados por depósito
SP	Sustancia P
STUI	Sintomas del Tracto Urinario Inferior
TKs	Taquicininas
TRP	Receptores vaniloides
TRPA1	Receptor de potencial transitorio canal catiónico, subtipo A1
TRPV1	Canal iónico de la familia de receptores vaniloides
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje

ÍNDICE

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO	3
1.2. UROTELIO Y SUBUROTELIO	18
1.3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	23
1.3.1. Regulación de las proteínas contráctiles	23
1.4. EXCITACIÓN DE LA MEMBRANA DE LA CÉLULA MUSCULAR	25
1.4.1. Potencial de membrana en reposo y potencial de acción	25
1.4.2. Papel del Ca^{2+} en la contracción	26
1.4.3. Canales de Ca^{2+}	27
1.4.3.1. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC)	28
1.4.3.2. Canales de Ca^{2+} activados por agonista	29
1.4.3.3. Canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOC).....	29
1.4.4. Mecanismos de liberación de Ca^{2+} intracelular	30
1.4.4.1. Receptor de Inositol trifosfato (IP_3R)	30
1.4.4.2. Receptor de rianodina (RyR)	32
1.4.5. Canales de K^{+}	32
1.4.5.1. Canales de K^{+} dependientes de ATP (K_{ATP}).....	33
1.4.5.2. Canales de K^{+} activados por Ca^{2+} (K_{Ca}).....	34
1.4.5.3. Canales de K^{+} activados por voltaje (K_V)	35
1.4.6. Canales activados por estiramiento	36
1.4.7. Canales activados por ligando.....	37
1.4.8. Actividad miogénica.....	37
1.4.9. Células intersticiales.....	39
1.5. CONTROL NERVIOSO Y HORMONAL	41
1.5.1. Mecanismos colinérgicos.....	41
1.5.1.1. Receptores muscarínicos	41
1.5.2. Mecanismos adrenérgicos	43
1.5.2.1. Receptores adrenérgicos α	44
1.5.2.2. Receptores adrenérgicos β	45
1.5.3. Mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos (NANC).....	46
1.5.3.1. Sistema purinérgico.....	47
1.5.3.2. Neurotransmisores gaseosos	49
1.5.3.2.1. Óxido nítrico (NO)	49

1.5.3.2.2.	Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S).....	50
1.5.3.3.	Neuropéptidos.....	51
1.5.3.3.1.	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP).....	52
1.5.3.3.2.	Taquicininas (TKs).....	53
1.5.3.3.3.	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	54
1.5.3.3.4.	Angiotensinas	55
1.5.3.4.	Prostanoides	55
1.5.3.5.	Endotelinas	57
1.6.	FISIOPATOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO	58
1.6.1.	Obstrucción ureteral aguda	58
1.6.1.1.	Epidemiología.....	58
1.6.1.2.	Fisiopatología.....	59
1.6.1.3.	Tratamiento farmacológico	61
1.6.2.	Reflujo Vésicoureteral (RVU).....	62
1.6.2.1.	Cuadros clínicos de RVU.....	64
1.6.2.2.	Diagnóstico del RVU.....	64
1.6.2.3.	Tratamiento del RVU.....	65
1.6.3.	Incontinencia Urinaria (IU).....	65
1.6.3.1.	Incontinencia Urinaria de Urgencia (IUU).....	67
1.6.3.2.	Incontinencia paradójica o por rebosamiento	68
1.6.3.3.	Incontinencia de Estrés o de Esfuerzo (IUE)	69
1.6.3.4.	Incontinencia por cuadros mixtos de urgencia y estrés	70
1.6.4.	Síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI).....	70
1.7.	BRADICININA y CALIDINA	72
1.7.1.	Síntesis y metabolismo de cininas.....	73
1.7.2.	Receptores de BK.....	75
1.7.3.	Antagonistas de receptores de BK	76
1.7.4.	Acción fisiológica y fisiopatológica de la BK.....	77
1.8.	FOSFODIESTERASAS (PDEs).....	80
1.8.1.	Fosfodiesterasas 4 y 5 (PDE4 y PDE5).....	81
1.8.2.	Fosfodiesterasas en el Tracto Urogenital	83
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	87
3.	MATERIAL y MÉTODOS	95

3.1.	MATERIAL	97
3.1.1.	Material biológico.....	97
3.1.2.	Material de laboratorio	97
3.1.2.1.	Instrumentación general.....	97
3.1.2.2.	Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting	97
3.1.2.3.	Equipamiento para la identificación de proteínas por inmunohistoquímica	98
3.1.2.4.	Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las preparaciones de músculo liso	99
3.1.2.5.	Equipamiento para el registro simultáneo de la tensión y la $[Ca^{2+}]_i$	99
3.1.3.	Reactivos.....	100
3.1.4.	Soluciones.....	101
3.1.4.1.	Soluciones fisiológicas	101
3.1.4.2.	Tampones utilizados para el Western blotting	103
3.1.4.3.	Soluciones para la inmunohistoquímica	106
3.2.	MÉTODOS.....	106
3.2.1.	Disección de preparaciones de músculo liso del uréter y del cuello vesical	106
3.2.2.	<i>Western blotting</i>	107
3.2.3.	Inmunohistoquímica	110
3.2.4.	Estudios funcionales	112
3.2.4.1.	Montaje y normalización de las preparaciones de uréter intravesical y cuello vesical	112
3.2.4.2.	Procedimiento experimental.....	113
3.2.4.3.	Medida simultánea de tensión y $[Ca^{2+}]_i$	114
3.2.4.4.	Cálculos y estadística	116
4.	RESULTADOS	117
4.1.	ACCIÓN DE LA BK SOBRE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL URÉTER INTRAVESICAL	119
4.1.1.	Expresión de los receptores B_1 y B_2	119
4.1.2.	Estudios Funcionales	121
4.1.2.1.	Efecto de la eliminación del urotelio y del bloqueo de los receptores B_1 y B_2 y de la COX en la contracción inducida por la BK.....	121

4.1.2.2.	Papel del Ca^{2+} extra e intracelular en la contracción inducida por la BK	124
4.1.2.3.	Modulación de los receptores de la BK en la neurotransmisión inhibidora NANC dependiente e independiente del NO en el uréter intravesical	126
4.2.	ACCIÓN DE LA BK SOBRE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL CUELLO VESICAL	128
4.2.1.	Expresión de los receptores B_1 y B_2	128
4.2.2.	Estudios Funcionales	130
4.2.2.1.	Efecto de la eliminación del urotelio y del bloqueo de los receptores B_1 y B_2 y de la COX en la contracción inducida por la BK	130
4.2.2.2.	Papel del Ca^{2+} extra e intracelular en la contracción inducida por la BK	132
4.2.2.3.	Efecto de la eliminación del urotelio y del bloqueo de los receptores B_1 , de la sintasa de NO, de la COX-1 y de los canales de K^+ en la relajación inducida por la calidina	134
4.2.2.4.	Modulación ejercida por los receptores de la BK sobre la neurotransmisión inhibidora NANC del cuello vesical	137
4.3.	RELAJACIÓN INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DE LA FOSFODIESTERASA 4 (PDE4) ROLIPRAM EN EL CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA	140
4.3.1.	Expresión de la PDE4 en el cuello vesical	140
4.3.2.	Estudios Funcionales	141
4.3.2.1.	Relajación inducida por el rolipram y por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafil en el cuello de la vejiga del cerdo	141
4.3.2.2.	Efecto de la presencia del urotelio y del bloqueo de la guanilato ciclasa soluble y de la vía de la COX en la relajación inducida por el rolipram	143
4.3.2.3.	Efecto de la activación de la adenilato ciclasa y del bloqueo de la PKA en la relajación inducida por el rolipram	144
4.3.2.4.	Efecto del bloqueo de los canales de K^+ en la relajación inducida por el rolipram	145
4.3.2.5.	Efecto del bloqueo de los canales de Ca^{2+} neuronales dependientes de voltaje y de la sintasa de NO y H_2S en la relajación inducida por el rolipram ..	147
4.3.2.6.	Cambios en la tensión y en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del músculo liso del cuello vesical inducidos por el rolipram	148
4.3.2.7.	Relajación inducida por el rolipram y por los inhibidores de la PDE5 en el cuello de la vejiga del hombre	150
5.	DISCUSIÓN	151

5.1.	IMPLICACIÓN DE LA BK EN LA REGULACIÓN DE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL URÉTER INTRAVESICAL DEL CERDO	153
5.2.	IMPLICACIÓN DE LA BK EN LA REGULACIÓN DE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL CUELLO VESICAL DEL CERDO	157
5.3.	IMPLICACIÓN DEL INHIBIDOR DE LA PDE4 ROLIPRAM EN LA REGULACIÓN DE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL CUELLO VESICAL.....	161
6.	CONCLUSIONES.....	167
7.	BIBLIOGRAFÍA	171
8.	ABSTRACT.....	205

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO

El aparato urinario está constituido por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra (Figura I). Los riñones constituyen una pareja de órganos simétricos dispuestos en la región pósterosuperior de la cavidad abdominal a ambos lados de la región dorsolumbar de la columna vertebral, aproximadamente entre la 1ª y 2ª vértebra dorsal y la 3ª vértebra lumbar, donde el riñón derecho se encuentra en un plano inferior al izquierdo, debido a la presencia del hígado. Un riñón adulto mide aproximadamente unos 11.5 cm de longitud, por 5.5 a 6 cm de anchura por 2.5 cm de grosor, pesando entre 120 y 170 gramos. Cada riñón está rodeado por tres capas de tejido: la cápsula renal (membrana transparente, fibrosa y continua con la capa externa del uréter), la cápsula adiposa (capa de grasa que protege el riñón) y la fascia renal (capa de tejido conjuntivo denso que separa la grasa perirrenal de la grasa pararrenal). Ambos riñones tienen forma de judía, con dos caras, anterior y posterior, un borde externo convexo, un borde interno, cóncavo en su centro, y dos polos redondeados, superior e inferior. En el centro de la parte cóncava se encuentra el hilio, por donde entran los vasos renales, linfáticos y los nervios y por donde el uréter abandona el riñón (Lazzetti & Rigutti, 2005; Drake et al., 2010).

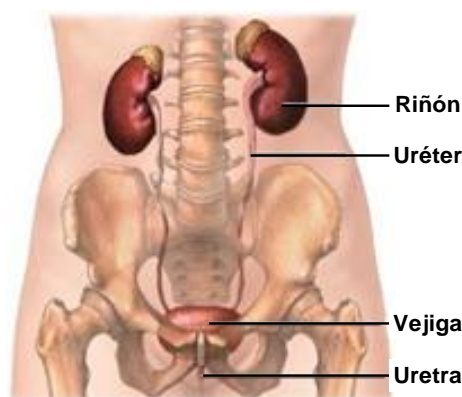


Figura I. **Estructura del Tracto Urinario.** Formado por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra. Adaptación de Olson (1998).

Los uréteres son dos conductos estrechos que drenan la orina desde los riñones a la vejiga (Figura I). Cada uréter es un tubo muscular con una longitud aproximada de 25 cm. La porción abdominal de cada uréter emerge ventralmente del hilio renal y se curva caudal y medialmente hacia la parte lateral de la vena cava caudal (lado derecho) o de la arteria aorta (lado izquierdo). Ambos uréteres discurren caudalmente en el

tejido subperitoneal, sobre la superficie del psoas mayor, cruzan los vasos ilíacos externos y entran en la cavidad pelviana, donde se disponen medialmente y perforan la pared dorsal de la vejiga formando un ángulo agudo cerca del cuello vesical. Morfológicamente el uréter presenta tres capas según un corte transversal (Desgrandchamps et al., 1997):

1. **Túnica mucosa.** Consta de un epitelio y una lámina propia. El epitelio ureteral es del tipo transicional constituido por cinco o seis capas de células mucinosas. La mucosa del uréter, excepto en la pelvis renal, está dispuesta en pliegues longitudinales que dan al interior un aspecto estrellado o festoneado.

2. **Túnica muscular.** Constituida por tres estratos: longitudinal interno, circular medio y longitudinal externo. Las capas de músculo liso están infiltradas por tejido conectivo de la lámina propia y la adventicia. La capa longitudinal externa aparece en el tercio inferior del uréter. La porción distal del uréter al penetrar en la vejiga a través de su capa muscular adquiere una dirección oblicua a la pared vesical diferenciándose tres segmentos: yuxtavesical, intramural y submucoso.

3. **Túnica serosa.** El revestimiento externo del uréter es una adventicia o serosa, según la extensión de la cubierta peritoneal, la cantidad de grasa periureteral y la altura del corte. Generalmente los cortes de los segmentos inferiores tienen serosa, mientras los más próximos al riñón no suelen poseerla. Esta adventicia está constituida por fibras colágenas y elásticas, dispuestas laxamente junto a cantidades variables de tejido adiposo alrededor de la periferia.

La vascularización ureteral es irregular y se realiza esencialmente a tres niveles. El uréter proximal está irrigado por la arteria ureteral, rama de la arteria renal, y por las ramas de arterias capsulares. El uréter medio está vascularizado por numerosas ramas provenientes de la arteria aorta, de las arterias ilíacas y de la arteria genital. El uréter distal es el segmento más vascularizado por ramas procedentes de las arterias vesicales (superior e inferior), y en el caso del sexo femenino, de la arteria uterina (Drake et al., 2010).

La inervación del uréter es llevada a cabo por medio de nervios ureterales proximales, medios y distales que derivan de los plexos renal, aórtico, hipogástrico anterior y pelviano. Las fibras aferentes derivan de los pares 11º y 12º torácicos, del 1º, 2º y 3º lumbares y de los 1º y 2º sacros. Asimismo, están las fibras aferentes de origen vagal en forma de grupos celulares ganglionares asociadas al tercio distal ureteral (uréter yuxtavesical e intravesical). Los nervios responsables de los segmentos

proximal, medio y distal lo hacen mediante los plexos hipogástricos superior, inferior y vesical (Kubo & Kawamura, 1992; Lang et al., 2002).

La vejiga forma parte del Tracto Urinario Inferior junto con la uretra y el músculo estriado periuretral, así como por la próstata en el varón, los cuales constituyen una unidad anatómica y funcional, cuya integridad y correcto funcionamiento son imprescindibles para una correcta continencia y micción (Drake et al., 2010).

La vejiga es un saco músculo-membranoso destinado a recoger la orina procedente de los riñones a través de los uréteres, la almacena y la elimina al exterior por la uretra durante la micción. Está situada en la excavación pélvica, inmediatamente por detrás del pubis, en el plano medio de la región del hipogastrio, por detrás limita con el recto, con la parte superior de la próstata y vesículas seminales en el hombre, y con la vagina en la mujer. Por encima está recubierta por el peritoneo parietal que lo separa de la cavidad abdominal, y por abajo limita con la próstata en el hombre y con la musculatura perineal en la mujer. La irrigación de la vejiga se lleva a cabo a través de arterias que provienen de la arteria iliaca interna directamente o de sus ramas como la arteria umbilical en la parte superior, la arteria génitovesical en su parte media o de la arteria pudenda en su parte inferior. Las venas drenan en un plexo venoso pélvico que recubre el espacio prevesical en su cara pósteroinferior y que finaliza en la vena hipogástrica. La linfa de la vejiga drena en los ganglios perivesicales, de ahí a los ilíacos externos y a los hipogástricos, que se reúnen en los ganglios del promontorio (Drake et al., 2010).

La innervación de la vejiga procede del: plexo lumboaórtico o hipogástrico, que contiene fibras nerviosas del sistema nervioso simpático y del plexo presacro, que contiene fibras nerviosas del sistema nervioso parasimpático (Andersson, 2002; Drake, 2007).

La capacidad fisiológica de almacenamiento de orina de la vejiga es de 300 mL a 350 mL, pudiendo aumentar a 1 o 2 litros en casos de retención aguda de orina. La vejiga presenta (Drake et al., 2010):

- Vértice anterosuperior en el que se fija el uraco o ligamento umbilical, que es una estructura alargada y fibrosa del alantoides, que comunica la cúpula de la vejiga urinaria con el ombligo, por dentro de la pared abdominal.
- Vértice ánteroinferior que corresponde al orificio uretral.
- Vértices súperoexternos en los que desembocan los uréteres.

La pared vesical está revestida por tres capas: capa externa o serosa, capa media o muscular y capa interna o mucosa. La capa serosa corresponde al peritoneo parietal que recubre la vejiga en su cara superior, mientras que el resto está recubierto por la capa adventicia (tejido conjuntivo de la región pélvica). La capa muscular está formada por músculo liso con tres capas: una capa externa o superficial y una capa interna o profunda, formadas por fibras musculares longitudinales y una capa media formada por fibras musculares circulares. La capa mucosa (urotelio) que tapiza interiormente la vejiga y está formada por una membrana basal, una capa intermedia y un epitelio apical superficial que es un epitelio de transición urinario estratificado de ocho capas de células umbrales impermeables a la orina (Figura II) (Drake *et al.*, 2010).

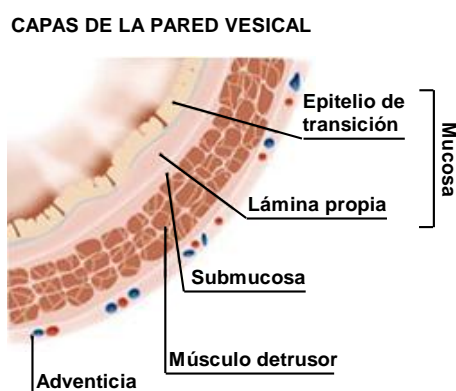


Figura II. **Esquema representativo de la pared vesical**, integrada por las capas adventicia, músculo detrusor, suburotelio y urotelio.

La vejiga urinaria se divide en dos partes: el cuerpo y la base. El cuerpo vesical es la porción superior y más amplia de la vejiga, que aumenta considerablemente de volumen cuando está llena de orina. La capa muscular de la vejiga corresponde al músculo detrusor y cuya contracción es esencial para garantizar el vaciado completo de la vejiga. La base comprende el cuarto inferior de la vejiga, está un poco por detrás y debajo del cuerpo y en ella desembocan los uréteres. La base, después de un corto trayecto se estrecha constituyendo el cuello vesical y se continua inmediatamente con la uretra. En la superficie interna de la base de la vejiga se distingue un relieve transversal de unos 5 cm con un orificio en cada extremo que corresponde a la entrada de los uréteres. Por debajo y delante se observa otro orificio, que es la continuación del cuello con la uretra. Este conjunto de dos orificios superiores separados por un saliente transversal y otro orificio inferior y posterior presentan una forma de triángulo

invertido por lo que esta zona recibe el nombre de trígono vesical (Figura III) (Drake et al., 2010).

La uretra es el último segmento de las vías urinarias responsable de llevar la orina al exterior. Su anatomía difiere en el hombre y en la mujer derivado del hecho que en el varón, además de su función urinaria, transporta el semen a nivel de su porción anterior, esponjosa o peneana (Figura IV).

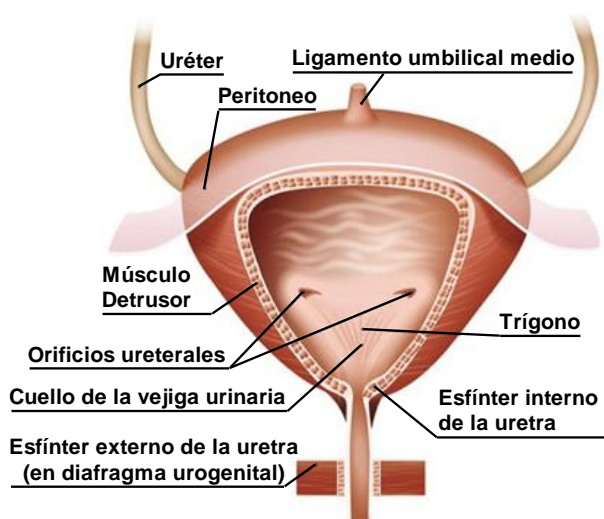


Figura III. **Estructura de la vejiga urinaria.** Formada por músculo detrusor, los meatos ureterales, que definen el trígono, el cuello y la uretra formando conjuntamente el esfínter uretral interno.

La uretra masculina se extiende desde el cuello vesical hasta la extremidad libre del pene o meato uretral (con una longitud aproximada de 16 cm), en la que se distinguen tres regiones: prostática, membranosa y esponjosa o peneana. La uretra prostática (con una longitud aproximada de 25 a 30 mm) atraviesa el espesor de la próstata de la que recibe su secreción a través de pequeños conductos que desembocan a través de pequeños orificios en su cara inferior. A continuación la uretra atraviesa el periné donde se rodea de un anillo de fibras musculares estriadas que constituyen el esfínter uretral externo (músculo estriado) de control voluntario. Esta es la porción membranosa de la uretra que mide aproximadamente 10 a 12 mm. La última, y más larga porción de la uretra es la esponjosa o peneana que desciende delante del recto unos pocos milímetros y luego se introduce para recoger el cuerpo esponjoso del pene ubicado por debajo de los cuerpos cavernosos, muy cerca de la superficie cutánea del periné. Termina en el glande por un orificio, el meato urinario, cuya longitud es de aproximadamente unos 15 cm.

La uretra femenina, que solo sirve para conducir la orina al exterior, es más corta y sencilla que la masculina. Mide alrededor de 3.5 a 4 cm y tiene un trayecto hacia abajo y un poco adelante ubicándose por detrás de la sínfisis pubiana y delante de la vejiga, desembocando en la extremidad anterior de la vulva, inmediatamente por detrás del clítoris.

La uretra esta formada por una capa interna o mucosa, una media (solo en el hombre) o conectiva laxa (en la mujer) y una externa o muscular lisa con fibras longitudinales y transversales. Estas últimas, en el origen del órgano se continúan con las del cuello vesical y constituyen el esfínter interno liso. El cierre de la uretra se da a partir de dos esfínteres uno involuntario (interno) y otro voluntario (externo)(Drake et al., 2010).

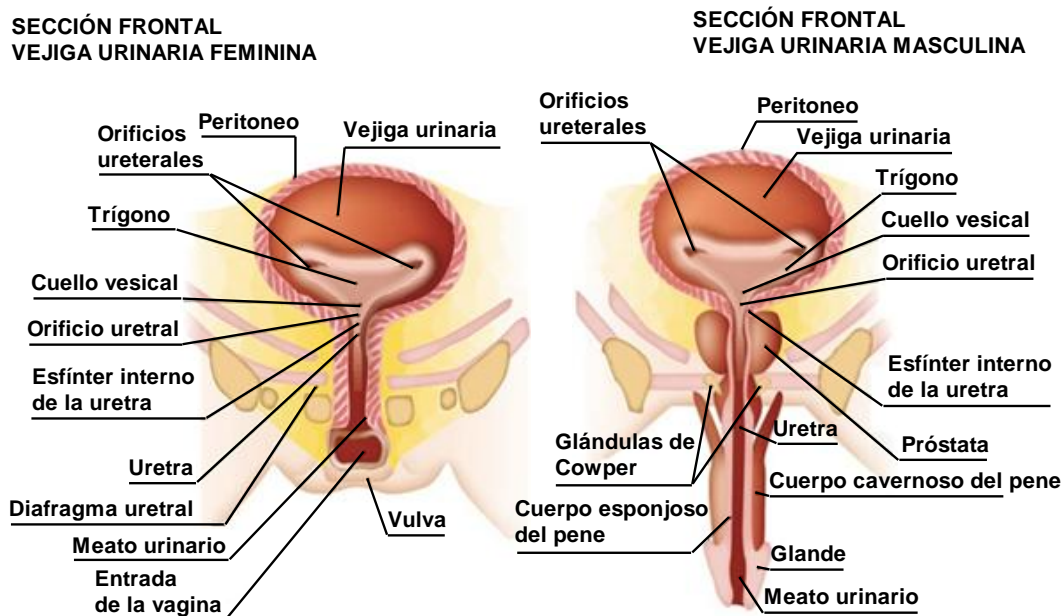


Figura IV. Estructura de la vejiga urinaria en la mujer y en el hombre.

El uréter es un órgano de funcionalidad autónoma con una musculatura e inervación independientes. El peristaltismo del uréter, es un factor primordial para el transporte de orina desde el riñón a la vejiga. Dicho peristaltismo, representa la contracción del músculo liso ureteral y es el resultado de la actividad eléctrica generada en un marcapasos. La ubicación del mismo ha sido objeto de controversia. Así, la mayoría de los investigadores han propuesto que el marcapasos se localiza en las regiones del sistema colector calicial cercano a la pelvis renal (Golenhofen &

Hannappel, 1973; Constantinou, 1974, 1978; Morita et al., 1981). No obstante, otros estudios lo sitúan en la unión pieloureteral (Notley, 1970; Manning & Snyder, 1989).

La unión pieloureteral coordina la actividad del marcapasos intrarrenal, la contracción de la pelvis renal o piélica y el peristaltismo ureteral, de forma que la frecuencia de las contracciones en los tramos altos es superior a las de los segmentos inferiores, pero las ureterales se efectúan a mayor presión que las piélicas. Por ello, la principal función de la unión pieloureteral sería, mediante su cierre, proteger al riñón de la elevada presión retrógrada ureteral. La unión pieloureteral actúa como un verdadero controlador de progresión de las ondas, permitiendo bien el bloqueo de las contracciones generadas a nivel calicial, o bien a su paso hasta el uréter, para convertirse en verdaderas ondas propulsoras. La existencia de una presión intrapiélica baja es esencial para asegurar una función renal normal. En áreas con presión oclusiva se logra mediante la actividad de propulsión muscular, sin embargo el peristaltismo piélico no es oclusivo, por lo que su presión depende no sólo del bombeo peristáltico, sino también de una resistencia baja de salida del flujo en la unión. Así que, una resistencia pasiva baja en la unión pieloureteral debe prevalecer para asegurar así el flujo de orina. El transporte de orina desde la pelvis al uréter se lleva a cabo mediante un gradiente de presiones. Este transporte ocurre sólo en la fase activa del peristaltismo, durante el desarrollo de las ondas de presión piélicas. A nivel pieloureteral se intentó discernir donde estarían situados los marcapasos, y se describieron ondas de contracción que iniciadas en los cálices, se propagan al uréter a través de pelvis renal, sin que existiese una ubicación concreta determinada. Por el contrario, otros estudios (Lang et al., 2002; Prieto Chaparro et al., 2002; Woolf & Davies, 2013) también han evidenciado, que la existencia de un marcapasos no siempre resulta necesaria para la generación de un movimiento peristáltico ureteral, puesto que la presencia de una adecuada presión intraluminal provocaría una descarga peristáltica que se propagaría desde las porciones más proximales a las más distales del uréter. Durante la fase de llenado precoz, la curva asciende describiendo una curva suave que representa la elasticidad del Tracto Urinario y su índice de incremento es una medida indirecta de la acomodación de la pared ureteral. Durante el flujo urinario fisiológico, los cambios de presión permanecen en esta fase. Posteriores aumentos de llenado generan una respuesta lineal entre presión y volumen, llegando al límite de la elasticidad ureteral, lo cual, produce sobredistensión, hecho verificado por la disposición de las fibras musculares, ya que el uréter aumenta su longitud y diámetro

tras aumentar la presión intraluminal. Backlund y Nordgren, propusieron varias teorías en relación a los mecanismos de conducción. Se ha descrito la existencia de fibras nerviosas amielínicas en la pared ureteral y las terminaciones nerviosas en asociación con las paredes musculares de los vasos y el músculo liso ureteral. No obstante, esta inervación no sería la única responsable de la propagación peristáltica porque la naturaleza de los potenciales de acción y su índice de propagación no son compatibles con la conducción nerviosa. En lo que se refiere a la teoría de conducción eléctrica, se sabe que la estimulación eléctrica del uréter provoca contracciones del mismo, esto es debido a que el estímulo es transmitido a través del espacio intercelular a las células adyacentes. El músculo ureteral exhibe dos tipos de variación del potencial de membrana: con cambios de potencial lentos y pequeños, acompañados de alteraciones en el tono celular que se propagaría de manera insignificante y que se han relacionado con función marcapasos y con potenciales en espiga junto a contracciones regulares (Backlund & Nordgren, 1966). La teoría del estímulo mecánico, expone que el aumento de la tensión ureteral es un estímulo adecuado para iniciar la contracción, existiendo una relación entre el grado de tensión y el potencial de membrana de la célula muscular. La propagación normal de la onda peristáltica ureteral requiere el acoplamiento excitación-contracción, de forma continuada, de la musculatura lisa ureteral. La actividad regular en el uréter intacto se debería a potenciales en espiga provenientes de un marcapasos y propagados a lo largo del uréter, cuando éste ha sido excitado por una adecuada distensión (Backlund & Nordgren, 1966). Sin embargo, en contra de esta teoría, se encuentra el hecho experimental de que la estimulación mecánica en el tercio superior del uréter, la unión pieloureteral y pelvis tengan escaso efecto sobre el peristaltismo (Prieto Chaparro et al., 2002).

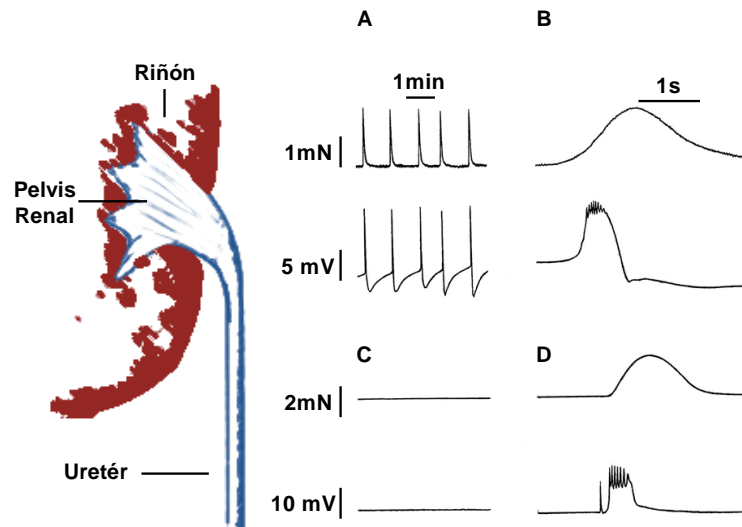


Figura V. **Sistema pieloureteral.** El peristaltismo ureteral se origina en la pelvis renal donde se recoge la orina producida en el riñón. La pelvis renal se activa espontáneamente (A y B) para generar una actividad marcapasos que se propaga por el uréter determinando así la propulsión de bolos de orina hacia la vejiga. El uréter (C) es usualmente inactivo, aunque existen marcapasos latentes en todos los niveles del Trato Pieloureteral, que puede ser excitado para generar potenciales de acción (D) y contracción muscular. Adaptación de Santicoli & Maggi (1998).

El uréter puede mantener su peristaltismo sin inervación externa, esto se visualiza en uréteres de riñones trasplantados, en los que la actividad del mismo no cambia significativamente en el injerto, aún con denervación renal y la posible redundancia del uréter. Por ello, se supone que la unidad pieloureteral posee una actividad intrínseca generada por las células marcapasos, que estarían situadas en la porción proximal del sistema colector. El peristaltismo puede ocurrir sin inervación, aunque el Sistema Nervioso Autónomo puede desempeñar un papel modulador de aquel e influiría en el tono ureteral (Prieto Chaparro et al., 2002).

La densidad de inervación autónoma aumenta de forma progresiva desde la pelvis renal hacia la vejiga, por lo que los segmentos ureterales distales son los que presentan una mayor presencia de fibras nerviosas autónomas, lo cual sugiere un mayor control nervioso a este nivel (Golenhofen & Hannappel, 1973). Tanto *in vivo* como *in vitro* se ha podido demostrar que las contracciones del músculo liso del Tracto Pieloureteral son más frecuentes pero menos potentes en las zonas proximales, incrementándose la potencia y reduciéndose la frecuencia, al alejarse del parénquima renal (Lang et al., 2002; Prieto Chaparro et al., 2002).

Los registros de presión ureteral *in vivo* en diversas especies revelan que el volumen de producción de orina afecta a la amplitud y frecuencia de las contracciones peristálticas en el uréter. El aumento de volumen de orina suele coincidir con el aumento de frecuencia, intensidad y duración de las contracciones. Si el flujo es normal, cuando se llena la pelvis existe un aumento de presión, empujando la orina en bolo al uréter, éste se desplaza mediante ondas que coaptan completamente las paredes ureterales, hasta la unión vesical que es una válvula unidireccional. Cuando el flujo aumenta excesivamente las paredes ureterales no coaptan y se transporta la orina mediante columna líquida provocando una función ureteral defectuosa. El flujo urinario determina el tamaño y forma del bolo urinario, el cual, a su vez, influye en los aspectos mecánicos de ritmo, frecuencia, amplitud peristáltica y presión basal (Prieto Chaparro et al., 2002). Estudios urodinámicos realizados en la unión uréterovesical, unidad funcional compuesta por un componente ureteral (uréter intravesical) y vesical (detrusor circundante), demuestran dos tipos de ondas de presión denominadas rápidas y lentas. Las ondas rápidas representan la actividad peristáltica ureteral, la cual favorece el transporte del bolo de orina a través del uréter y su vaciado a la vejiga urinaria, mientras que las ondas lentas, debido a la influencia del detrusor, impiden el reflujo vésicoureteral, una vez evacuado el bolo de orina a la vejiga (Dixon et al., 1998).

El Trato Urinario Inferior tiene función doble, el almacenamiento y la eliminación periódica de orina producida en el riñón. Estas dos funciones son resultado de una compleja interrelación en la que participan de forma sinérgica la vejiga, la musculatura del cuello vesical, la uretra (músculo liso y músculo estriado) y el diafragma pelviano. La vejiga y la uretra presentan una inervación somática (responsable de la contracción voluntaria del músculo estriado o rabdoesfínter) y vegetativa (responsable de la contractilidad involuntaria del músculo liso) (Guyton & Hall, 2006).

La micción es el proceso de evacuación de orina de la vejiga, a través de la uretra cuando se ha alcanzado un dintel de llenado vesical. En el adulto, dicha actividad es producida por un acto reflejo que, a través de una vía espinobulboespinal, coordina la actividad del centro pontino de la micción y de la sustancia gris periacueductal del tronco del encéfalo. En el feto y el neonato, la micción es básicamente un reflejo espinal, el cual durante el desarrollo se transforma en un reflejo bulboespinal bajo el control suprapontino. La orina que llega constantemente a la vejiga va produciendo un estiramiento de sus paredes, la cual se va adaptando o acomodando a los volúmenes crecientes. En la paredes de la vejiga se localizan los receptores de estiramiento que

captan la presión y el aumento de volumen de la vejiga, los cuales, son responsables de la generación de las señales aferentes del arco reflejo de la micción. Estos estímulos son conducidos por los nervios pélvicos e hipogástricos. A la médula espinal llegan señales activadoras e inhibitoras procedentes del tallo cerebral y de la corteza, siendo el centro pontino troncoencefálico el responsable del inicio de la micción (Drake et al., 2010).

La vejiga y la uretra están inervadas por el SNA: nervio hipogástrico y nervio pélvico, de naturaleza simpática y parasimpática respectivamente. Sin embargo, el esfínter estriado y todo el piso perineal están regulados somáticamente a través de las ramas sensitivas y motoras del nervio pudendo interno (Figura VI). La inervación vegetativa, de naturaleza simpática y parasimpática, es responsable de la sensibilidad vesical y de la contractilidad del detrusor y del esfínter interno uretral. La inervación parasimpática se origina en las astas laterales de los segmentos medulares sacros. Los nervios sacros guían las fibras parasimpáticas que confluyen para formar los nervios pélvicos que terminan en pequeños ganglios cerca de la vejiga, de ellos emergen fibras postganglionares que terminan en receptores sensitivos y fibras musculares. La inervación simpática se origina en las astas laterales de los mielómeros toracolumbares T11-L2 (de Groat, 2006). Las fibras que emergen del raquis con los correspondientes nervios raquídeos se desprenden de ellos por las ramas comunicantes que van confluir en los ganglios de la cadena simpática lumbar. El nivel postganglionar se inicia con los nervios espláncnicos que se originan en un plexo cuyos componentes provienen de dicha cadena. Los nervios espláncnicos emiten ramas que se anastomosan para formar el plexo hipogástrico, sus ramas vesicales se anastomosan con las de los nervios pélvicos y penetran en la vejiga.

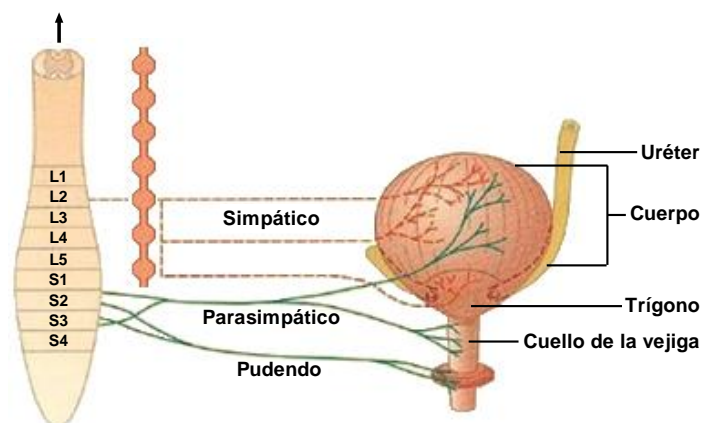


Figura VI. Inervación de la vejiga urinaria. Adaptación de (Guyton & Hall, 2006).

La médula espinal, recibe influencias de niveles superiores del Sistema Nervioso Central (tronco cerebral, centros extrapiramidales, tálamo y corteza cerebral parietal y frontal). La regulación ejercida por el SNA es modulada por centros medulares y encefálicos de forma antagónica, la activación simpática favorece el llenado de la vejiga, mientras que el Sistema Nervioso Parasimpático regula su vaciado. Las fibras parasimpáticas constituyen la principal inervación excitadora del detrusor a través de los nervios pélvicos que conectan con la médula espinal a través de los segmentos sacros S2-S4 (Núcleo de Onuf). En los nervios pélvicos discurren tanto fibras nerviosas sensitivas como motoras. Las fibras sensitivas detectan el grado de distensión de la pared de la vejiga, siendo dicha señal mecánica, responsable del inicio de los reflejos que provocan el vaciado de la vejiga. El Sistema Parasimpático a través del asta lateral de la médula sacra actúa mediante la liberación de acetilcolina (ACh) a nivel de los ganglios del plexo pélvico (efecto nicotínico) donde estimulan las fibras postganglionares que a su vez liberan ACh en el músculo detrusor e inducen su contracción vía activación de los receptores muscarínicos M_2 y M_3 (Hegde, 2006). La liberación de ACh desde las terminaciones nerviosas parasimpáticas se produce conjuntamente con adenosina 5'-trifosfato (ATP), el cual actúa como cotransmisor parasimpático responsable de la contracción resistente a la atropina a través de la activación de los receptores purinérgicos P2X (principalmente del subtipo P2X₁₋₃), cuya expresión se encuentra incrementada en la hiperactividad vesical (Burnstock, 1972, 2007, 2013). Del mismo modo, los nervios parasimpáticos ejercen un efecto relajante en el músculo liso de la uretra a través de la liberación de óxido nítrico (NO) (Yoshimura & Chancellor, 2003; Andersson & Arner, 2004).

Los centros motores simpáticos estimulan la contracción del músculo liso del cuello de la vejiga y de la uretra y la relajación del detrusor. Las neuronas preganglionares simpáticas se localizan en el asta intermediolateral de los mielómeros toracolumbares T11-L2 (Yoshimura & Chancellor, 2003; de Groat, 2006). Dichas fibras preganglionares liberan ACh que se une a receptores nicotínicos de las fibras postganglionares, las cuales, discurren por el nervio hipogástrico liberando noradrenalina (NA) en sus terminaciones. Esta NA produce una potente relajación del detrusor vía activación de los receptores adrenérgicos β_2 y β_3 y una contracción mediada a través de una población de receptores adrenérgicos α_1 del cuello vesical (Nomiya & Yamaguchi, 2003; Yazaki et al., 2011).

La innervación somática es responsable de la contracción del músculo estriado del esfínter uretral externo. Dichas fibras se originan en las astas anteriores de los segmentos medulares sacros S2-S4, salen por las raíces anteriores y constituyen el nervio pudendo. La estimulación de dicho nervio produce la contracción del músculo estriado del esfínter uretral externo a través de la liberación de ACh desde sus terminaciones, la cual se une a receptores nicotínicos presentes en la membrana de la célula muscular (Yoshimura & Chancellor, 2003). Asimismo, existen conexiones entre los centros sacro y pudendo, lo que permite la coordinación entre ambos centros durante la micción y la interrupción voluntaria del vaciado vesical. Los nervios hipogástrico, pélvico y pudendo llevan, además, señales sensoriales a través de aferentes que van desde la vejiga y la uretra a la médula espinal lumbosacra (Yoshimura & Chancellor, 2003). Las aferentes del nervio pélvico, monitorizan el volumen de la vejiga en la fase de llenado, así como la amplitud de las contracciones vesicales durante la micción. Dicha innervación sensorial está integrada por fibras III Aδ ligeramente mielinizadas presentes en la capa muscular y por fibras IV C amielinizadas de localización más dispersa en el músculo y por debajo y en el interior del urotelio (Andersson, 2002; Yoshimura & Chancellor, 2003). Estas fibras C pueden ser sensibles o insensibles a la neurotoxina sensorial, capsaicina, presentan un umbral más alto de generación de impulsos en respuesta al estiramiento de la pared vesical que las fibras Aδ (Habler et al., 1990, 1993). Estas últimas, además, responden principalmente a la distensión vesical mientras que las fibras C también pueden ser activadas por varios neurotransmisores, como el ATP, las taquicininas y las cininas, liberados desde el urotelio y el detrusor (Patacchini et al., 2005; Aizawa et al., 2011).

Durante la fase de llenado, la vejiga actúa como un recipiente que se va acomodando al incremento de volumen de orina, debido a la elasticidad de sus fibras musculares y a su tono, sin que por ello se produzca un aumento significativo de la presión intravesical, por lo que no se percibe la sensación de llenado hasta alcanzar su capacidad máxima fisiológica (Yoshimura & Chancellor, 2003; Yoshimura et al., 2008). La distensión de la vejiga causada por el acúmulo de orina, constituye la señal mecánica, la cual, es transmitida en forma de impulsos nerviosos a través de las fibras nerviosas aferentes tipo III Aδ hasta los segmentos medulares sacros S2-S4, activando motoneuronas del nervio pudendo y la consecuente liberación de ACh que produce la contracción del esfínter uretral externo, promoviendo así, la continencia urinaria. Dichas aferentes activan, simultáneamente, los centros motores simpáticos (localizados

en los segmentos medulares toracolumbares T11-L2), los cuales, liberan NA desde el plexo hipogástrico, causando relajación del detrusor a través de receptores β_3 y β_2 y contracción del esfínter interno (integrado por la musculatura lisa del cuello vesical y de la uretra proximal) vía activación de receptores adrenérgicos α_1 (Figura VII) (Yoshimura & Chancellor, 2003).

Cuando se alcanza un dintel de llenado de la vejiga urinaria (alrededor de 150-200 ml), surge la sensación de llenado vesical y el deseo miccional, sensación que irá aumentando hasta los 500 ml aproximadamente. Pero si no es el momento adecuado para orinar, por estimulación somática, a través del nervio pudendo, se origina la contracción y el cierre potente del esfínter estriado externo aumentando la resistencia uretral, de manera que ésta es mayor que la presión vesical, para evitar pérdidas de orina.

Como se ha descrito anteriormente, la distensión de la pared vesical como consecuencia del llenado de orina constituye la señal mecánica responsable del inicio de la micción. Dicho vaciado es producido por la activación motora del nervio pélvico y consecuente liberación de ACh, la cual, produce contracción del detrusor a través de los receptores muscarínicos M_3 y M_2 . Este hecho junto con la relajación involuntaria del esfínter interno y la relajación voluntaria del esfínter estriado externo uretral promueve un vaciado completo de la vejiga. De esta manera, el proceso miccional que realizamos como un acto fisiológico automatizado, es el resultado de un complejo mecanismo de coordinación entre la vejiga y la uretra (Figura VII) (Yoshimura & Chancellor, 2003; Hernández & Bustamante, 2010).

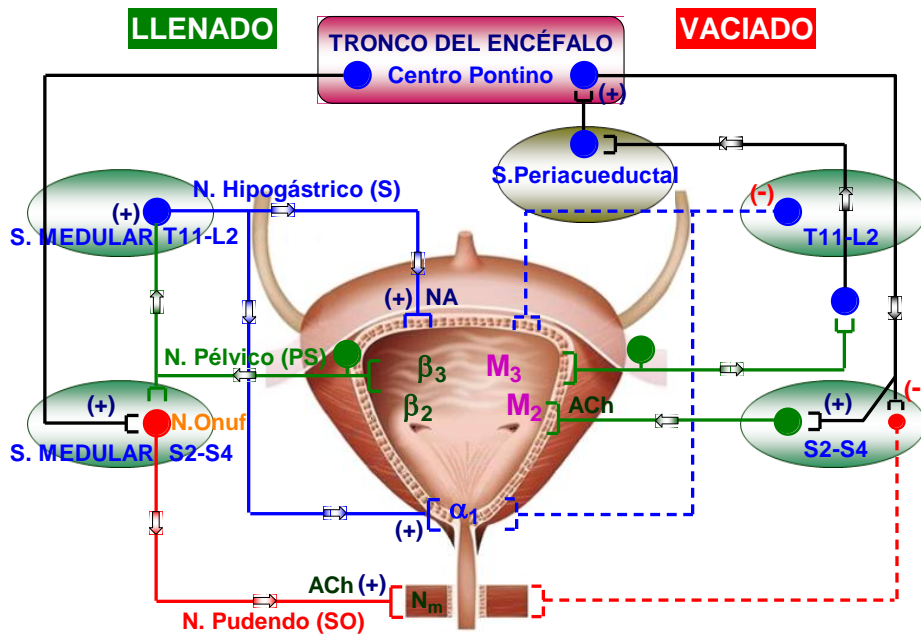


Figura VII. **Regulación nerviosa del llenado y vaciado de la vejiga urinaria.** Durante la fase de llenado, la distensión de la vejiga da lugar a la activación de la rama sensitiva, constituida por fibras nerviosas aferentes tipo III A δ , del nervio pélvico, que provoca la activación del núcleo de Onuf, localizado en segmentos medulares sacros S2-S4 y salida del nervio pudendo con la consecuente liberación de ACh, produciéndose la contracción del esfínter uretral externo vía conjugación con receptores nicotínicos musculares (Nm). Dichas aferentes también estimulan la liberación de NA desde el plexo hipogástrico, produciendo relajación del detrusor vía receptores β_3 y β_2 y contracción del esfínter uretral interno, vía receptores adrenérgicos α_1 . Una vez alcanzada la capacidad máxima fisiológica, se produce la activación motora del nervio pélvico y se libera ATP y ACh que producen contracción del detrusor vía receptores purinérgicos P2X $_1$ y muscarínicos M $_3$ y M $_2$, respectivamente. Asimismo, el ATP, vía conjugación con receptores P2Y $_1$ y el NO, a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble y de los canales de K $^+$ de membrana, producen relajación del músculo liso del cuello de la vejiga y uretral proximal. Finalmente, se produce una inhibición somática del nervio pudendo, favoreciendo así, la relajación del esfínter estriado externo uretral. Todos estos procesos, en conjunto, ocasionan el vaciado completo de la vejiga. Adaptación de (Hernández & Bustamante, 2010).

En situaciones en que el vaciado de la vejiga es incorrecto se produce la llamada “*retención urinaria*”, con presencia o ausencia de residuo urinario, que puede ser debido a: una contracción del detrusor insuficiente; una resistencia uretral incrementada o la presencia de ambas alteraciones. En los casos en que se produce una elevación súbita de la presión intravesical, como ocurre en la tos o en el estornudo, se desarrolla el designado “efecto guardián” o reflejo de almacenaje adicional (Figura VIII). Así, el incremento repentino de la presión intravesical produce la activación de los nervios

hipogástrico y pélvico provocando la liberación de serotonina (5-HT) y NA desde el núcleo de Onuf, llevando así, a la activación somática del nervio pudendo con la consecuente liberación de ACh que promueve la contracción de la musculatura estriada del esfínter uretral externo originando un cierre uretral rápido y potente con objeto de impedir posibles escapes de orina (Thor, 2003; Sadananda et al., 2011).

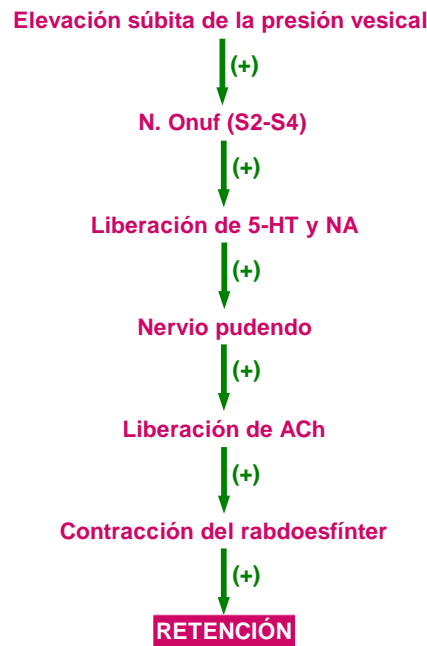


Figura VIII. **Reflejo de almacenaje adicional.** La elevación súbita de la presión intravesical estimula la liberación desde el núcleo de Onuf de 5-HT y NA, las cuales, llevan a la activación somática del nervio pudendo con liberación de ACh causando la contracción del esfínter uretral externo, vía activación de los receptores nicotínicos de la musculatura estriada, y consecuente retención urinaria. Adaptación de (Hernández & Bustamante, 2010).

1.2. UROTELIO Y SUBUROTELIO

El urotelio es una capa que recubre gran parte de las vías urinarias, incluyendo los uréteres, la vejiga y parte de la uretra. El tejido urotelial es altamente específico para el Tracto Urinario, y tiene una alta elasticidad y resistencia eléctrica transepitelial. Consta de al menos 3 capas: basal, intermedia y apical superficial. La capa superficial, donde se encuentran las denominadas "células en paraguas", tiene un papel destacado en el mantenimiento de la función barrera del urotelio. Estas células se encuentran intercomunicadas por estrechas uniones encargadas de reducir el movimiento de iones y solutos entre las células. En su superficie se encuentran proteínas cristalinas llamadas

uropiaquinas que reducen la permeabilidad de pequeñas moléculas como la urea, el agua y los protones, así como los lípidos especializados (Apodaca, 2004).

El urotelio ha sido considerado una barrera física frente a la mayoría de las sustancias presentes en la orina, protegiendo así a los tejidos subyacentes. Diferentes factores locales como el pH tisular, los traumatismos mecánicos, químicos o las infecciones bacterianas, pueden alterar esta función de barrera, conllevando al paso de agua, urea y de sustancias tóxicas a los tejidos subyacentes, o a la liberación de sustancias neuroactivas desde el urotelio que dan lugar a cambios en la sensibilidad neuronal produciendo urgencia, frecuencia y dolor en la micción. En consecuencia, la comunicación entre las células del urotelio y el Sistema Nervioso tiene importantes repercusiones en la disfuncionalidad vesical. Asimismo, la pérdida de la integridad de la barrera urotelial también se relaciona con la expresión de sustancias como el factor antiproliferativo, el cual enlentece el crecimiento de las células uroteliales (Lewis, 2000; Apodaca, 2004).

Además de la función del urotelio como barrera física también es un tejido metabólicamente muy activo que ejerce su función en las fases de llenado y vaciado vesical (Andersson & Arner, 2004). Diversos estudios han demostrado la existencia de nervios aferentes y eferentes en la proximidad del urotelio lo cual, pone de manifiesto la interacción entre el urotelio y los nervios (Dickson et al., 2006; Apodaca et al., 2007; Birder & Andersson, 2013). De hecho, el urotelio es una estructura altamente especializada capaz de detectar y responder a estímulos fisiológicos, mecánicos, químicos o térmicos y de favorecer la liberación de mediadores químicos, que pueden a su vez, modificar la excitabilidad de los nervios aferentes, sugiriendo por tanto, un papel importante en las vías sensoriales del Tracto Urinario Inferior (Birder et al., 2010; Birder & Andersson, 2013). Además, el urotelio juega un papel trascendental en la sensación visceral, ya que dichas células funcionan como transductores primarios de estímulos físicos y químicos y son capaces de comunicar con células subyacentes como neuronas, células musculares, miofibroblastos y células inflamatorias (Birder et al., 2010).

La funcionalidad del urotelio está acreditada por la presencia de una amplia variedad de receptores y canales iónicos en la membrana plasmática de la célula urotelial. Así, se ha descrito la presencia de receptores de la bradicinina (BK) (Chopra et al., 2005; Ochodnický et al., 2013a), las neurotrofinas (trkA y p75) (Murray et al., 2004; Girard et al., 2011; de Groat, 2013), el ATP (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆,

P2X₇, P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄) (Burnstock, 2001; Shabir et al., 2013; Sui et al., 2014), la adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃) (Yu et al., 2006; Dunning-Davies et al., 2013), la NA (β_1 y β_2) (Birder et al., 1998; Moro et al., 2013), ACh (nicotínicos α_7 y muscarínicos M₁, M₂ y M₃) (Beckel et al., 2006; Datta et al., 2010), los receptores activados por proteasas (D'Andrea et al., 2003), los canales de Na⁺ (Du et al., 2007), los receptores vaniloides (TRPV₁, TRPV₂, TRPV₄, TRPM₈ y TRPA₁) (Stein et al., 2004; Yu et al., 2011), el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Saban et al., 2010), el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisario (PACAP, PAC₁ y VPAC) (Girard et al., 2008; Girard et al., 2012), los estrógenos (ER α y ER β) (Teng et al., 2008), las endotelinas (ET_A y ET_B) (Mumtaz et al., 1999) y el factor liberador de corticotropina (CRF₁ y CRF₂) (LaBerge et al., 2006). La expresión de estos receptores en las membranas celulares, dota a estas células de la capacidad para responder a distintos estímulos, tales como, la distensión de la pared vesical durante la fase de llenado, sustancias solubles encontradas en orina, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), o mediadores químicos, tales como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el factor liberador de corticotropina (CRF), la ACh, la NA, el ATP y la adenosina liberados desde nervios, células inflamatorias y vasos sanguíneos (Apodaca, 2004; LaBerge et al., 2006; Birder et al., 2010; Birder & Andersson, 2013).

Las células uroteliales son capaces de liberar transmisores y/o moduladores, como el ATP, el NO, la ACh, SP y las prostaglandinas (PGs) mediante exocitosis dependientes de calcio (Ca²⁺), similar a la liberación de neurotransmisores. La liberación de dichos mediadores químicos sugiere que las células uroteliales poseen propiedades sensoriales y de señalización especializadas que permiten la comunicación recíproca con células vecinas, nervios y con otros tipos de células, como las células inmunitarias, inflamatorias y miofibroblastos (Apodaca et al., 2007; Birder & Andersson, 2013). No obstante, el mecanismo por el cual son liberados estos mediadores químicos es actualmente objeto de estudio (Birder et al., 2010).

La distensión vesical induce la liberación de ATP desde el urotelio, el cual actúa de manera autocrina, en células del propio urotelio, y de forma paracrina, en células intersticiales y nervios del Tracto Urinario Inferior (Sui et al., 2014). El ATP liberado tanto desde células de la capa apical como de la capa basal en respuesta al estiramiento, activa los receptores uroteliales P2X₂ y P2X₃ estimulando la exocitosis y promoviendo un incremento de la superficie de las células umbrales durante la fase de llenado (Truschel et al., 2002). Asimismo, la presencia de uniones *gap* o en hendidura

entre las células intersticiales determina que las señales generadas en el urotelio se transmitan al músculo detrusor (Ikeda et al., 2007).

La unión del ATP a los receptores de las fibras sensoriales, inicia una cascada de segundos mensajeros que modulan la actividad de diversos canales iónicos (Figura IX). Un ejemplo de dicha regulación viene representado por el hecho que el incremento de la liberación de ATP desde el urotelio en situaciones fisiopatológicas, como en las cistitis intersticiales, provocan sensación dolorosa, debido al aumento de las corrientes iónicas del receptor TRPV₁ (Tominaga et al., 2001). Dicho canal iónico se encuentra en las células del urotelio, en las fibras sensoriales y en células intersticiales (Birder, 2001) y se activa por capsaicina, calor, protones y por metabolitos lipídicos como la anandamida (Caterina et al., 1997). En las fibras aferentes, estos canales integran y/o amplifican la respuesta a diferentes estímulos irritantes responsables de la inflamación y se encuentran sobreexpresados en el urotelio y en los nervios en la hiperactividad del detrusor (Andersson, 2010). Dichos receptores, además de transmitir la sensación dolorosa están involucrados en el llenado de la vejiga a través de la liberación de NO (Birder, 2006).

La ACh liberada desde el urotelio activa los receptores muscarínicos localizados en el músculo liso y en las células uroteliales, y los receptores nicotínicos localizados en los nervios. Dichos receptores son estimulados por la ACh liberada desde urotelio y desde nervios colinérgicos próximos a estas células uroteliales, originando un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y provocando la liberación de NO, ATP y de un factor urotelial relajante del músculo liso (Beckel et al., 2006; Hanna-Mitchell et al., 2007). En el urotelio se expresan, además, los receptores adrenérgicos α y β , que dan lugar a la liberación de distintos mediadores como el ATP y el NO (Birder, 2001). Posiblemente la liberación neuronal de la NA tenga efecto en el urotelio y por tanto, en la funcionalidad vesical debido a la innervación noradrenérgica existente en la microcirculación vesical y en el suburotelio (Dickson et al., 2006).

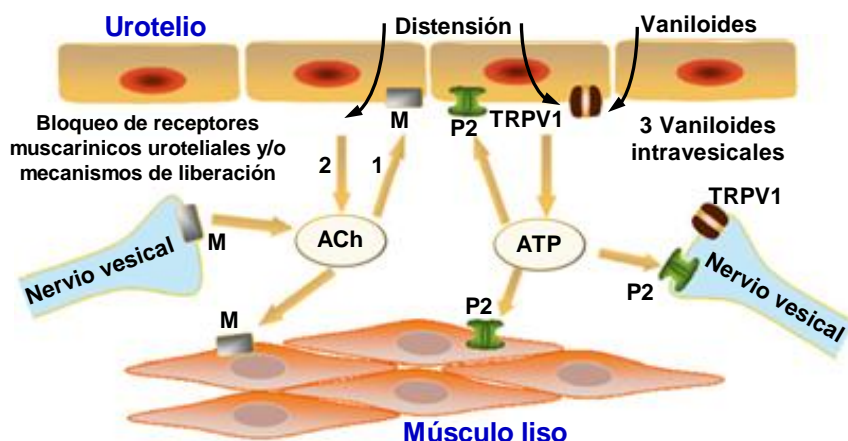


Figura IX. Representación esquemática de la posible implicación de “moléculas sensoras” uroteliales y/o mecanismos de liberación en la función vesical. Durante el llenado de la vejiga, el incremento de la presión induce la liberación de la ACh desde el urotelio y desde neuronas que activa los receptores muscarínicos del músculo liso. La ACh liberada estimularía los receptores muscarínicos presentes tanto en el urotelio como en los nervios de la vejiga. La estimulación de los receptores muscarínicos por la ACh liberada desde el urotelio (1) o por otros mecanismos de liberación urotelial (2) puede ser relevante en patologías crónicas vesicales y en el envejecimiento. Las células uroteliales también expresan receptores TRPV₁ que se pueden activar durante la distensión vesical y por compuestos vaniloides. La activación del receptor TRPV₁ urotelial puede conducir a la liberación de neurotransmisores como el ATP que activa los receptores purinérgicos (P2X₃) de las aferentes próximas de la vejiga, las cuales también contienen receptores TRPV₁ que se activan por los compuestos vaniloides. El ATP liberado por el urotelio puede activar otros receptores purinérgicos presentes en el músculo liso y en el urotelio. El tratamiento intravesical con vaniloides puede provocar la activación/desensibilización de los receptores TRPV₁ uroteliales o el vaciamiento de mediadores derivados del urotelio (3). Adaptación de (Birder, 2005).

El NO está involucrado en diversas funciones del Tracto Urinario Inferior, tales como su participación en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga (Hernández et al., 2008) y uretra (Andersson, 2007; Game et al., 2013).

El urotelio interacciona íntimamente con la capa suburotelial subyacente, en particular, con la red celular intersticial contenida en su interior, así la estructura conjunta urotelio-suburotelio actúa como una unidad funcional (Andersson, 2002). Se han descrito tres tipos de tejido urotelial (uréter/pelvis; detrusor/trígono; cuello/uretra proximal), pero la importancia en cuanto a la funcionalidad de cada uno de ellos está aún por determinar (Birder et al., 2010; Birder & Andersson, 2013).

1.3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

1.3.1. Regulación de las proteínas contráctiles

La contracción de la musculatura lisa está regulada por variaciones en los niveles citosólicos de Ca^{2+} , lo que afecta a las interacciones entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina a través de las dos proteínas asociadas a la actina en el filamento fino: tropomiosina y troponina. También forman parte de los filamentos finos otras dos proteínas: caldesmón y calponina. El caldesmón es una proteína conjugada a calmodulina y actina que se ha encontrado en la maquinaria contráctil del músculo liso (Furst et al., 1986). El caldesmón podría ser de importancia para la regulación cooperativa de la formación de puentes cruzados entre la actina y miosina, pero su papel en la contracción de la vejiga urinaria está aún por determinar. La calponina es una proteína asociada a los filamentos de actina y está localizada en el citoesqueleto y en los dominios contráctiles de las células musculares lisas (North et al., 1994). La eliminación del gen de calponina h1 está asociada con un desarrollo más rápido de la tensión de la musculatura lisa de la vejiga urinaria (Fujishige et al., 2002).

En reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es de 0.1 μM . La formación de enlaces cruzados entre la actina y la miosina, necesaria para la contracción muscular, requiere un incremento del Ca^{2+} citosólico a niveles superiores a 10-100 μM . Dicha elevación se produce como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través canales de Ca^{2+} dependientes (tipo L) e independientes de voltaje y por su liberación desde el depósito intracelular representado por el retículo sarcoplásmico (RS) (Arner & Pfitzer, 1999).

El Ca^{2+} activa proteínas contráctiles a través de la unión de este a la proteína calmodulina. La calmodulina es una pequeña proteína citosólica constituida por una sola cadena polipeptídica y fija Ca^{2+} con una alta afinidad (pudiendo unir de forma cooperativa hasta cuatro moléculas de Ca^{2+} , para formar el complejo Ca^{2+} /calmodulina. Dicha unión induce un cambio conformacional en la calmodulina que facilita la interacción con proteínas diana, una de las cuales es la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Esta unión provoca la activación de MLCK, la cual, fosforila la cadena ligera reguladora de miosina (MLC) en el residuo serina-19 (Ser-19). Esta fosforilación desencadena la formación de puentes cruzados actina-miosina provocando la contracción muscular (Ding et al., 2009).

El cese de la contracción es debido, en parte, al descenso en la $[Ca^{2+}]_i$ con el consecuente descenso de la actividad de la MLCK, y en parte a la desfosforilación de la MLC por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). La disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ a niveles basales es producida por la recaptación de Ca^{2+} por el RS, como consecuencia de la actividad de la bomba SERCA localizada en la membrana del RS (introduce dos iones de Ca^{2+} al RS por molécula de ATP hidrolizada) y por la actuación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana celular que transporta Ca^{2+} al exterior en contra de su gradiente de concentración (Ding et al., 2009). Así, la fosforilación reversible de la MLC tiene un papel importante en la contracción del músculo liso. El ciclo de puentes cruzados se producirá mientras la miosina es fosforilada. Por tanto, la cinasa activadora (MLCK) y la fosfatasa inactivadora (MLCP) son las dos vías reguladoras principales de la contracción y la relajación muscular, respectivamente (Somlyo & Somlyo, 2003).

Cuando la contracción se produce sin una elevación proporcional de la $[Ca^{2+}]_i$ se denomina proceso de "*sensibilización al Ca^{2+}* " o "*incremento de la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil*", en el que la regulación de MLCP tiene un papel fundamental (Somlyo & Somlyo, 2003). Así, diferentes agonistas fisiológicos no sólo modificarían la $[Ca^{2+}]_i$ sino que también cambiarían la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} . De hecho, la MLCK puede ser fosforilada, lo cual disminuye su afinidad por el complejo Ca^{2+} /calmodulina reduciendo la sensibilidad al Ca^{2+} (Ding et al., 2009).

La MLCP también se inhibe por fosforilación. Una de las principales vías de inhibición involucra a una cinasa específica (Rho-cinasa asociada), la cual presenta tres isoformas: RhoA, RhoB y RhoC (Somlyo & Somlyo, 2003). Estas proteínas son activadas por el paso de GDP a GTP, este paso es controlado por otras proteínas como GDI, GAP y GEF. En el músculo liso relajado, la Rho se encuentra en el citosol en forma de complejo Rho-GDP-GDI, y su activación, en presencia de GTP, está catalizada por Rho-GEF, lo cual produce la translocación de Rho a la membrana celular (Gong et al., 1997). La Rho activa la Rho-cinasa asociada (RhoK), cuya activación da lugar a una fosforilación de la miosina conjugada de la MLCP, inhibiéndola, sugiriendo así, el papel determinante que desempeña la Rho en la sensibilización al Ca^{2+} en la contracción del músculo liso (Kimura et al., 1996). En la vejiga urinaria están presentes las dos isoformas de la RhoK (RhoK I y RhoK II) y los bloqueantes de estas dos isoformas inhiben la contracción de la ACh en la vejiga urinaria de conejo, indicando

así, la implicación de la vía de la Rho cinasa en el acoplamiento excitación-contracción de los receptores colinérgicos muscarínicos en la vejiga urinaria (Jezior et al., 2001).

La vía de la Rho cinasa puede estar alterada en desórdenes urológicos, tales como, la obstrucción del flujo de salida, en la que la RhoK I está sobreexpresada, lo cual, favorece una relajación lenta y un tono muscular alterado (Aydin et al., 2010).

El GMPc, la proteína cinasa dependiente del GMP_c (PKG), el AMPc y la proteína cinasa dependiente del AMPc (PKA), pueden inhibir la contracción inducida por Ca²⁺ y la sensibilización al Ca²⁺ produciendo, en última instancia, relajación muscular (Pfitzer et al., 1984). Además, la PKA y la PKG fosforilan la Rho inhibiendo su acción sensibilizante al Ca²⁺ (Sauzeau et al., 2000).

1.4. EXCITACIÓN DE LA MEMBRANA DE LA CÉLULA MUSCULAR

1.4.1. Potencial de membrana en reposo y potencial de acción

El comportamiento electrofisiológico de la célula muscular lisa ha sido estudiado en varias especies. Dichos estudios han demostrado la existencia de potenciales de acción espontáneos asociados a bajas ondas de despolarización (Andersson & Arner, 2004). Generalmente los potenciales se muestran como espigas aisladas a intervalos regulares y ocasionalmente aparecen ráfagas de espigas que pueden ser registradas. La frecuencia de los potenciales de acción espontáneos es dependiente del voltaje, de manera que la despolarización incrementa la frecuencia de disparo y la hiperpolarización la disminuye, estando asociados a un incremento de la [Ca²⁺]_i. Sin embargo, la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares puede amplificar el incremento en la [Ca²⁺]_i asociado con los potenciales de acción. Dichas elevaciones se producen en los haces musculares propagándose a otras fibras musculares a través de comunicaciones intercelulares conocidas como "*uniones gap*" o "*uniones en hendidura*", que son orificios de la pared celular a través de los cuales se produce la propagación de los potenciales de acción sin prácticamente encontrar resistencia alguna a su paso (Hashitani et al., 2001).

Estudios *in vitro* con células ureterales de cobaya han demostrado que las corrientes iónicas se caracterizan por la presencia de espigas repetitivas sobre la fase de meseta (-20 mV), las cuales, son el resultado de la combinación de la activación

repetitiva de la corriente de iones de Ca^{2+} y de la corriente de iones de K^{+} dependiente de Ca^{2+} . La fase de meseta es mantenida por una lenta inactivación de la corriente de Ca^{2+} y posiblemente por una entrada tardía dependiente de Na^{+} . La corriente de salida transitoria independiente de Ca^{2+} es demasiado pequeña para que tenga una significación funcional como corriente repolarizante. Un aumento gradual en la concentración basal es suficiente para repolarizar la célula al potencial de membrana residual (Imaizumi et al., 1990).

Existe una gran variabilidad en los valores del potencial de membrana en reposo del detrusor según la especie estudiada (conejo: -37mV, cobaya: -40mV, rata: -47mV, hombre: de -47 a -55mV) (Brading, 1992). En el detrusor humano, la fase ascendente o de activación del potencial de acción (despolarización), es generada por una corriente de entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC) tipo L (Andersson, 2010). La fase descendente o de inactivación del potencial de acción (repolarización) involucra la inactivación de la corriente de Ca^{2+} y la activación de una corriente de salida de K^{+} que es dependiente, parcialmente, de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Imaizumi et al., 1998).

1.4.2. Papel del Ca^{2+} en la contracción

El Ca^{2+} cumple un papel fundamental en la despolarización eléctrica de la membrana y en el proceso de excitación-contracción de la célula muscular lisa. La entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L, es el acontecimiento principal que da lugar a los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólica mediados por la despolarización. El influjo de Ca^{2+} , en los estadios iniciales del potencial de acción, provoca la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el RS, por debajo de la membrana celular generando las llamadas “zonas calientes” próximas a la membrana celular que favorecen el inicio de la contracción (Imaizumi et al., 1998). Dicha liberación de Ca^{2+} desde el RS es un hecho esencial tanto para la contracción producida por estimulación nerviosa como para la inducida por los agonistas siendo necesario un RS funcionalmente activo (Damaser et al., 1997).

El influjo de Ca^{2+} está regulado por un mecanismo de retroalimentación, en el cual, el descenso de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduce la actividad de los canales de K^{+} activados por

Ca^{2+} (K_{Ca}), produciendo así, la despolarización de la membrana celular y el incremento en la conductancia de los canales VOC tipo L (Wu et al., 2002)

1.4.3. Canales de Ca^{2+}

Las células del músculo liso poseen varios tipos de canales permeables al Ca^{2+} , siendo éstos, unas grandes moléculas glicoproteicas que se distribuyen en la superficie de la membrana celular, permitiendo de forma controlada la entrada Ca^{2+} desde el medio extracelular al interior de la célula. Así, junto con los canales VOC, la membrana de la célula muscular lisa presenta otros canales permeables al Ca^{2+} que no son dependientes de cambios en el voltaje, como son los canales activados por agonistas que se unen a receptores acoplados a proteínas G (canales ROC) y los canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOC) activados tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} del RS (McFadzean & Gibson, 2002; Zhao et al., 2013).

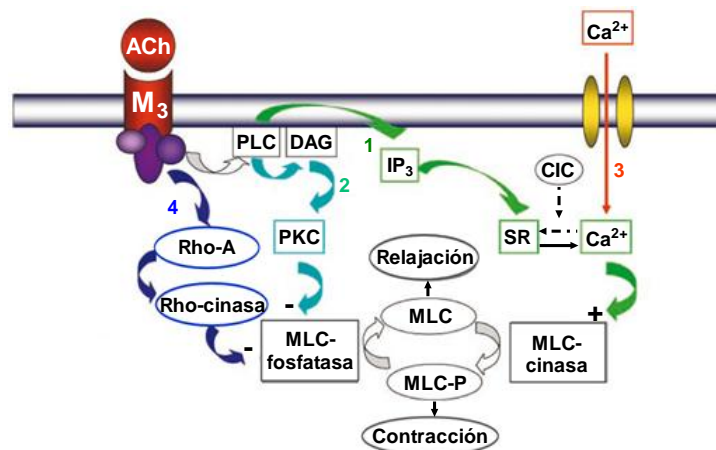


Figura X. **Vías de señalización implicadas en la contracción del detrusor a través de los receptores muscarínicos M_3 .** ACh: Acetilcolina; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol, PKC, proteína cinasa C; MLC, cadena ligera de miosina; SR, retículo sarcoplásmico; CIC liberación de calcio inducida por calcio. Existen diferencias entre las especies en la contribución de las distintas vías en la contracción. En el detrusor humano, el influjo de Ca^{2+} es la de mayor relevancia. Adaptación de (Andersson & Arner, 2004).

1.4.3.1. *Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC)*

La familia de los canales VOC incluye los tipos L-, N-, P/Q-, R- y T-, caracterizándose sobre la base de la similitud en las secuencias de aminoácidos y a sus características electrofisiológicas. Atendiendo al grado de despolarización necesaria para su apertura se dividen en dos grupos, los denominados de alto umbral de activación, al activarse por grandes despolarizaciones (> -30 mV), y los de bajo umbral de activación por requerir sólo ligeras despolarizaciones (> -60 mV) sobre el potencial de membrana de reposo de la célula. Los canales de alto umbral de excitación comprenden los L-, N-, P/Q- y R-, que se diferencian tanto por sus características biofísicas (tiempo medio de apertura, cinética y mecanismo de inactivación) como por su sensibilidad a los fármacos. Los canales conocidos como de tipo no-L tienen en común la insensibilidad a las dihidropiridinas, e incluyen a los N-, los P/Q- y los R- (Furukawa, 2014). Bajo la denominación de canales de bajo umbral de activación se encuentran exclusivamente los canales T (Smirnov & Aaronson, 1992). Dichos canales se activan a bajo nivel de potencial de membrana y rápidamente son inactivados pudiendo ejercer un importante papel en la actividad marcapasos de tejidos como el miocardio (Bean, 1985) y las neuronas de rata (Swandulla et al., 1991).

Los principales canales de Ca^{2+} activados por voltaje son los tipo L-, que se caracterizan por su activación a potenciales de membrana alrededor de -40 mV y generan corrientes de entrada de Ca^{2+} que son amplias y de larga duración (Smirnov & Aaronson, 1992). La implicación de otros tipos de canales VOC, además de los tipo L, en la activación del músculo detrusor es poco conocido, sin embargo se ha sugerido, que la entrada de Ca^{2+} se produce a través de los canales de tipo L y de tipo T, si bien la actividad de los canales tipo T sería más relevante a potenciales de membrana próximos al de reposo (Chow et al., 2003). En el detrusor humano, la activación inducida por el agonista de los receptores muscarínicos carbacol involucra canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas (Zagorodnyuk et al., 2009). Por lo tanto, el influjo de Ca^{2+} a través de los canales VOC tipo L parece ser el mecanismo determinante en la contracción del músculo detrusor (Wu et al., 2002; Chow et al., 2003).

Estudios llevados a cabo en la pelvis renal y el uréter de cobaya (Imaizumi et al., 1990), rata (Smith et al., 2002) y ratón (Lang et al., 2006), revelaron que la contracción de la musculatura lisa es esencialmente dependiente del influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L. En algunos casos, la activación de canales de Ca^{2+} de

conductancia intermedia (VOC tipo N) en dicha contracción ha sido demostrada en la contracción del músculo liso del Tracto Urinario (Maggi *et al.*, 1989).

1.4.3.2. Canales de Ca^{2+} activados por agonista

El término ROC hace referencia a cualquier canal de membrana cuya apertura está mediada por la unión al receptor de un agonista independientemente de cambios en el potencial de acción (Bolton, 1979). Son canales de cationes (mono y divalentes) no selectivos, permeables al Ca^{2+} . Dentro de los ROC se encuentran los canales operados por ligando en los que el sitio de unión del ligando y el poro iónico se encuentran en la misma proteína. En el caso en que el canal iónico y el receptor estén separados existen diferentes rutas intracelulares que comprenden tanto la activación del receptor como la apertura de un canal de cationes no selectivo de acuerdo al tipo de receptor, tejido y especie animal. El flujo de iones a través de estos canales se produce atendiendo al gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática y son operativos a valores de potencial de membrana en reposo (-60 mV) inhibiéndose por la despolarización de la misma. Se ha propuesto que la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales podría afectar a las corrientes de Cl^- y/o la activación de canales de K^+ alterando el potencial de membrana y provocando la posterior activación de los canales VOC, aceptando así que el flujo de iones a través de los canales ROC participa en los cambios del potencial de membrana (Large, 2002; Piper & Large, 2003).

En el músculo liso se han descrito diferentes agonistas capaces de causar la apertura de dichos canales, los cuales, poseen una elevada permeabilidad al Ca^{2+} y median procesos de contracción caracterizados por una moderada despolarización celular o incluso nula (Okamoto *et al.*, 2002).

1.4.3.3. Canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOC)

La entrada de Ca^{2+} operada por depósito o almacén fue propuesta por Putney en 1986, que usó el término de “*entrada de Ca^{2+} capacitativa*” para describir el fenómeno de acoplamiento entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS y la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana en células no excitables. Así, el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} activa la entrada de Ca^{2+} a través de canales localizados en la membrana

plasmática para rellenar los almacenes. A este tipo de canales se los ha denominado SOC (Putney, 2011).

Aunque la existencia de canales SOC ha sido caracterizado en diversos tejidos, el mecanismo de activación de dichos canales, sigue siendo objeto de debate. En el urotelio de la vejiga humana, se ha demostrado que canales SOC están implicados en la regulación de la liberación de ATP desde el urotelio (Matsumoto-Miyai et al., 2011), y en menor medida, en la contracción colinérgica de la vejiga de rata (Schneider et al., 2004b) y del hombre (Schneider et al., 2004a).

1.4.4. Mecanismos de liberación de Ca^{2+} intracelular

El almacenamiento de Ca^{2+} en las organelas celulares está sujeto no solo a una importante regulación fisiológica, sino también a una intervención en la liberación de Ca^{2+} durante la señalización celular. El principal compartimento intracelular de Ca^{2+} en las células musculares lisas se localiza en el RS. En las células musculares lisas en reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS es 1 mM, concentración 10.000 veces superior a la que existe en el citoplasma de la célula muscular ($0.1 \mu\text{M}$). Para que se pueda producir la contracción muscular es necesario que dicha concentración se eleve a concentraciones superiores a $10\text{-}100 \mu\text{M}$, siendo dicho incremento el resultado del influjo de Ca^{2+} extracelular y de la liberación de Ca^{2+} del RS. El inositol trifosfato (IP_3) a través de los receptores IP_3 localizados en la membrana del RS produce la liberación de Ca^{2+} almacenado en su interior. Asimismo, se produce liberación de Ca^{2+} por la presencia de Ca^{2+} citosólico ("*liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* ") vía activación de los receptores de rianodina presentes en la membrana del RS (Kasri et al., 2004; Berridge, 2008). El RS puede participar, asimismo, en la contracción vesical a través de la modulación de la actividad de los canales de K^+ de la membrana celular responsables de la hiperpolarización de la musculatura lisa (Yoshikawa et al., 1996).

1.4.4.1. Receptor de Inositol trifosfato (IP_3R)

En respuesta a una amplia variedad de estímulos (neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento), las diferentes isoformas de la enzima fosfolipasa C (PLC) catalizan la hidrólisis de un precursor localizado en la membrana plasmática, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para formar inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol

(DAG). Esta vía de señalización puede ser activada de diferentes maneras: por receptores acoplados a proteínas G, por receptores acoplados a la activación de tirosina cinasas o por incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Rebecchi & Pentyala, 2000; Litjens et al., 2007).

Los receptores de inositol trifosfato (IP_3R) están localizados en la membrana del RS y son constituidos por cuatro subunidades. Cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 260 kDa y 6 segmentos transmembrana, con los típicos dominios localizados en el extremo terminal C, que anclan la proteína a la membrana y albergan el poro y un dominio terminal N que queda libre en el citoplasma y que posee en su parte final la zona de unión para el IP_3 (Miyakawa et al., 2001). Existen tres isoformas de IP_3R (IP_3R_1 , IP_3R_2 , IP_3R_3), involucrados en la señalización de Ca^{2+} mediada a través de IP_3 , los cuales, difieren en su afinidad por el IP_3 , en su regulación y en su modulación por proteínas asociadas. EL IP_3R_1 es muy sensible al ATP y está involucrado en las oscilaciones transitorias de Ca^{2+} . El IP_3R_2 es el más sensible a IP_3 y media la oscilación regular de Ca^{2+} de larga duración, mientras que el IP_3R_3 es el menos sensible a IP_3 y al Ca^{2+} , por lo cual tiende a generar corrientes de Ca^{2+} monofásicas (Berridge, 2007).

Para la apertura del canal se requiere tanto Ca^{2+} como IP_3 , pues solamente el Ca^{2+} es insuficiente para provocar la activación del IP_3R , han sido encontrados diversos sitios de unión del Ca^{2+} en los IP_3R (Miyakawa et al., 2001). El Ca^{2+} regula la actividad del canal de manera bifásica dependiendo de la $[Ca^{2+}]_i$. Ante bajas $[Ca^{2+}]_i$, el ión ejerce un papel activador, mientras que altas concentraciones desempeña una acción inhibitoria, existiendo así un mecanismo de retroalimentación negativo durante la liberación de Ca^{2+} (Mak et al., 2001). También se ha descrito que el propio contenido de Ca^{2+} del RS regula la apertura del canal. Así, en hepatocitos permeabilizados se ha demostrado que un incremento de la $[Ca^{2+}]$ en el RS aumenta la sensibilidad de los receptores de IP_3 por su ligando, promoviendo así una liberación espontánea de Ca^{2+} (Nunn & Taylor, 1992). La liberación de Ca^{2+} del RS es detenida cuando la $[Ca^{2+}]$ en su interior está por debajo del 80% de sus niveles normales (1 mM) con la célula muscular en reposo (Shmygol & Wray, 2005).

1.4.4.2. Receptor de rianodina (RyR)

Otra vía de liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares es a través de la unión del alcaloide rianodina a sus receptores (RyR) localizados en el RS (Kotlikoff et al., 2002). El RyR presenta una forma de tetrámero, con el extremo terminal C formando el poro y un extremo terminal N que se proyecta hacia el citosol. Han sido descritas tres isoformas de RyR (RyR₁, RyR₂ y RyR₃) en el músculo liso (Coussin et al., 2000). Las bajas concentraciones de Ca^{2+} (en el rango nanomolar) constituyen el principal activador de los RyR en el músculo liso durante el proceso de “*liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* ” mientras que altas concentraciones (en el rango micromolar) provocan su inactivación (Zahradnik et al., 2005).

De manera general se acepta que la estimulación de receptores acoplados a proteínas G por parte de diferentes agonistas (ET, ANG II, 5-HT, NA, ACh), la formación de IP_3 y la activación de los receptores de IP_3 causan la liberación de Ca^{2+} del RS (Berridge, 1993). Esta señal de Ca^{2+} se amplifica por la activación de los RyR debido a la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Estos receptores están también involucrados en la liberación de Ca^{2+} desde el RS producida por el estiramiento del detrusor (Hotta et al., 2007).

1.4.5. Canales de K^+

El canal de K^+ es un tetrámero, formado por cuatro subunidades alfa idénticas. Existen diferentes tipos de canales de K^+ , según su estructura se pueden clasificar en los que tienen 6 dominios (regiones o segmentos) transmembrana y un poro, que suelen ser operados por cambios en el voltaje de la membrana celular, los que poseen dos poros y cuatro segmentos transmembrana, son independientes de voltaje y permiten la salida lenta de K^+ (rectificadores lentos) y los que tienen un poro y dos segmentos transmembrana, que se tetramerizan (rectificadores de entrada de K^+). Además, algunos de los canales de K^+ son algo más complejos y se asocian a receptores de mediadores químicos (González et al., 2012).

Las técnicas electrofisiológicas y el empleo de toxinas que bloquean selectivamente los diferentes tipos de canales de K^+ , constituyen una excelente herramienta para el conocimiento de los mismos, permitiéndonos una mejor comprensión acerca de su relevancia fisiofarmacológica y terapéutica en la disfuncionalidad motora del Tracto Urinario. Diferentes agonistas de canales de K^+

producen una relajación del uréter humano y del cerdo (Weiss et al., 2002). La actividad del músculo detrusor es modulada esencialmente por la activación de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) y de los canales K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}), mientras que la contribución de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) es moderada (Andersson & Arner, 2004).

1.4.5.1. Canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP})

Son canales a través de los cuales se produce la salida de K^+ al espacio extracelular para hiperpolarizar la membrana celular, impidiendo que se activen los canales de Ca^{2+} . Además, actúan como sensores metabólicos celulares regulando así, la excitabilidad de la membrana plasmática (González et al., 2012; Petkov, 2012).

Los canales K_{ATP} deben su nombre a la regulación inhibitoria conferida por el ATP intracelular, por lo que un descenso en la concentración de este nucleótido favorece la activación del canal. Estos canales, además de participar en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo modulan el potencial de acción desempeñando así, un papel fundamental en la regulación de la contractilidad de la musculatura lisa (Ko et al., 2008).

El músculo liso de la vejiga expresa canales K_{ATP} , los cuales, están involucrados en la regulación de la contractilidad vesical (Andersson, 1992). Activadores de los canales K_{ATP} como la cromakalima producen la hiperpolarización de la membrana de la célula muscular por la apertura de dichos canales y la consecuente salida de K^+ reduciendo, y en algunos casos, llegando a abolir los potenciales de acción relacionados con la generación de las contracciones fásicas (Petkov et al., 2001). En el uréter humano y del cerdo, este agonista disminuye la frecuencia de contracción (Weiss et al., 2002), mientras que en el detrusor humano, dichos agentes no sólo reducen las contracciones espontáneas, sino también las respuestas producidas por estimulación eléctrica transmural, carbachol y altas concentraciones de K^+ extracelular (Darblade et al., 2006).

1.4.5.2. *Canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K_{Ca})*

Los canales K_{Ca} son abundantes en el músculo liso y están constituidos por dos subunidades. Los canales de K⁺ activados por el aumento de la [Ca²⁺]_i están estructuralmente relacionados con los canales K_v (González et al., 2012). Estos canales producen la hiperpolarización de la membrana celular que sigue al potencial de acción, posibilitando así la adaptación a la frecuencia de disparo de los potenciales de acción. En células no excitables, estos canales contribuyen a mantener el potencial de membrana y participan la regulación del transporte de electrolitos en algunos epitelios (Andersson & Arner, 2004).

Existen 3 tipos fundamentales de K_{Ca} que difieren en sus conductancias iónicas y en su sensibilidad a la activación por Ca²⁺ o al voltaje. Los canales de K_{Ca} de alta conductancia (BK_{Ca}) se activan con [Ca²⁺]_i variables (10 nM-10 μM) y son sensibles a la despolarización de la membrana. Los canales de K_{Ca} de baja conductancia (SK_{Ca}) se caracterizan por su alta sensibilidad al Ca²⁺ (activación a concentraciones entre 200-500 nM), por no ser dependientes del potencial de membrana y poseer baja conductancia iónica. Los canales de K_{Ca} de intermedia conductancia (IK_{Ca}) se activan por [Ca²⁺]_i en un rango entre 10 nM-1 μM y, ocasionalmente, son sensibles a modificaciones en el potencial de membrana (Petkov, 2012; Berkefeld & Fakler, 2013).

Los canales BK_{Ca} son los canales de K⁺ más importantes en la regulación de la funcionalidad del detrusor (Petkov, 2011). Asimismo, desempeñan un papel esencial en la repolarización de la membrana celular modulando, así, la duración del potencial de acción y el influjo de Ca²⁺ extracelular (Berkefeld et al., 2010). Los canales SK_{Ca} están involucrados en el aumento de la permeabilidad al K⁺ inducido por los neurotransmisores y las hormonas en las células musculares lisas, en las células glomerulares de la corteza adrenal y en los hepatocitos (Petkov, 2012). Están, además, involucrados en la fase de post-hiperpolarización lenta consecutiva a los potenciales de acción en muchas células excitables, en estas células tras la espiga se produce una repolarización, que se desglobo en la que se denomina una fase de rápida post-hiperpolarización que dura entre 50-100 ms y una posterior más lenta entre 500-1000 ms en la que participan los canales SK_{Ca} previamente descrita en neuronas de los ganglios simpáticos y en las motoneuronas de la médula espinal (Petkov, 2012). Esta fase de lenta post-hiperpolarización depende del Ca²⁺ extracelular, anulándose si éste no está presente o si se bloquea su entrada (Hille, 1986). La entrada de Ca²⁺ extracelular

a través de canales VOC activa canales BK_{Ca} y SK_{Ca} , pero la liberación de Ca^{2+} a través de receptores de rianodina de la membrana del RS únicamente activa a los canales BK_{Ca} (Herrera & Nelson, 2002; Hristov et al., 2011).

En el detrusor, los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} están involucrados en la regulación del potencial de membrana y en la modulación de las contracciones espontáneas (Herrera et al., 2000). Los canales BK_{Ca} están integrados por una subunidad α , que forma el poro del canal y una subunidad accesoria β_1 específica del músculo. Esta subunidad β_1 es expresada en el detrusor normal y la falta de dicha subunidad reduce la actividad del canal produciendo, en última instancia, un incremento de la contractilidad de la pared vesical (Hristov et al., 2011; Petkov, 2012). En el detrusor humano, las corrientes de los canales BK_{Ca} y de los canales SK_{Ca} regulan la excitabilidad de la musculatura lisa de la vejiga urinaria (Herrera & Nelson, 2002).

1.4.5.3. *Canales de K^+ activados por voltaje (K_v)*

Los canales K_v constituyen el grupo más numeroso de canales de K^+ . Dichos canales presentan una elevada conductancia al K^+ (107 iones por segundo) en respuesta a un cambio en el potencial de membrana, pero también pueden ser regulados más lentamente por la activación de receptores asociados a proteínas G, que se asocian al propio canal iónico actuando como efector. Se han descrito doce tipos de canales K_v (K_{v1} - K_{v12}) con sus diferentes isoformas, que se agrupan en cuatro familias en función de la homología existente entre sus secuencias de aminoácidos: K_{v1} - K_{v6} , K_{v8} - K_{v9} , K_{v7} y K_{v10} - K_{v12} . Las propiedades del canal dependerán de la combinación de subunidades que lo formen, pudiendo estar constituidos por cuatro subunidades idénticas (homotetrámeros) o distintas (heterotetrámeros), pero siempre pertenecientes a la misma familia (Gutman et al., 2003).

Los canales K_v incluyen a los denominados canales de K^+ rectificadores tardíos, cuya función fisiológica es la de repolarizar la célula y devolverla al potencial de reposo tras la fase despolarizante del potencial de acción. Estos canales, asimismo, generan corrientes de K^+ independientes de Ca^{2+} y son activados por despolarización en un rango de voltaje cercano al potencial de reposo del músculo detrusor, desempeñando así, un papel fundamental en la modulación de la actividad del mismo (Thorneloe & Nelson, 2003). De hecho, en el detrusor humano se expresan las subunidades funcionalmente activas $K_{v1.3}$ y $K_{v1.6}$ de los canales $K_{v\alpha 1}$ (Davies et al.,

2002), mientras que en el detrusor de rata se ha demostrado una escasa presencia de canales de $K_{V1.2}$ y $K_{V1.5}$ (Ohya et al., 2000). El bloqueo de las corrientes $K_{V\alpha1}$ incrementan la amplitud de las contracciones fásicas espontáneas del detrusor sin modificar la frecuencia de las mismas ni la tensión basal. Sin embargo, el papel de dichos canales *in vivo* está aún por determinar (Gopalakrishnan & Shieh, 2004; Wulff et al., 2009).

1.4.6. Canales activados por estiramiento

Estos canales actúan como sensores detectando cambios en la longitud de la pared vesical. Diversos estudios sugieren que el estiramiento mecánico de la pared de la vejiga durante la fase de llenado, produce la activación de canales iónicos no específicos (Wellner & Isenberg, 1993). Estos canales son permeables a los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y su activación es producida previa hiperpolarización de la membrana de la célula muscular. Si una célula en reposo es estirada un 20% de su longitud original, el influjo de Ca^{2+} a través del canal es suficiente para alcanzar una $[Ca^{2+}]_i$ significativa, capaz de despolarizar la célula y provocar el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} tipo L (Fry et al., 1998). En el detrusor de ratón y conejo, el incremento en la longitud de la célula resulta de la sincronización de la activación de receptores de rianodina, la liberación de Ca^{2+} desde el RS y la penetración de Ca^{2+} extracelular. Esta liberación no se ve afectada por los RyR que median la liberación de Ca^{2+} , pero es completamente bloqueada por la rianodina. Por otro lado, esta liberación, activa corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} , sugiriendo así el papel de estos canales como reguladores del mecanismo de contracción espontánea (Ji et al., 2002). Dichos mecanismos ejercen, así, un papel esencial en la regulación miogénica de la contractilidad del detrusor durante la fase de llenado de la vejiga pudiendo la inhibición de dichos canales mejorar la acomodación vesical (Tertyshnikova et al., 2003).

En el uréter de cobaya, el estiramiento origina un incremento de la liberación de ATP, produciendo la contracción de la musculatura lisa ureteral. Sin embargo, el mecanismo por lo cual estos canales regulan la actividad espontánea del uréter está aún por dilucidar (Knight et al., 2002).

1.4.7. Canales activados por ligando

Los canales activados por ligando están integrados por proteínas oligoméricas (multisubunidades), ya sean homoméricas (subunidades idénticas, como el receptor nicotínico neuronal tipo α_7) o heteroméricas (subunidades distintas, como casi todas las otras variedades de receptores colinérgicos). Dichos canales están presentes en numerosas células y utilizan diversos agonistas. En el detrusor se ha demostrado la existencia de canales iónicos activados por ligandos como la ACh y el ATP. Así, los receptores purinérgicos P2X están involucrados en la contracción inducida por el ATP. La activación de estos canales genera una corriente de entrada principalmente de Na^+ y Ca^{2+} que conduce a la despolarización, la cual, genera la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L, dando lugar a la generación de potenciales de acción (Li et al., 2008).

1.4.8. Actividad miogénica

La actividad miogénica se define como la capacidad que tiene la célula muscular lisa de generar contracciones independientes de un estímulo externo, siendo ésta, una de las características más importantes de la musculatura lisa de la vejiga urinaria. Las células del detrusor y del trigono del hombre están acopladas eléctricamente a través de *uniones gap* o también denominadas *uniones en hendidura*, que son orificios de la pared celular a través de los cuales se produce la propagación de los potenciales de acción sin prácticamente encontrar resistencia alguna a su paso (Wang et al., 2001), por lo que dicha comunicación intercelular desempeña un papel esencial en el inicio y mantenimiento de la tensión de la musculatura lisa de la pared vesical (John et al., 2001). La presencia de *uniones gap* junto con el SNA y los mecanismos de transducción miogénica constituyen la denominada "*triada de tejido sincitial*", responsable de la modulación local del tono del músculo liso (Karicheti & Christ, 2001). De hecho, se ha sugerido que el detrusor está ordenado en módulos que limitan zonas musculares durante el ciclo miccional, los cuales, estarían controlados por plexos miovesicales periféricos compuestos por ganglios intramurales, células intersticiales y conexiones intracelulares (Drake et al., 2001; Drake et al., 2003).

El detrusor presenta una actividad rítmica espontánea *in vivo* e *in vitro* de naturaleza miogénica, siendo la frecuencia de estas contracciones espontáneas

dependiente de la especie, (más frecuente en el conejo que en el cerdo y en el hombre) y de condiciones experimentales (tiempo de estabilización de la muestra, temperatura, pH, etc.) (Herrera et al., 2000; Drake et al., 2003). Dicha actividad está relacionada con la generación de potenciales de acción espontáneos o la alteración en la capacidad de las organelas celulares para regular el Ca^{2+} intracelular (Montgomery & Fry, 1992). Estas contracciones son resistentes al bloqueo con la tetrodotoxina (TTX), el hexametonio, la atropina, el prazosin, el propranolol o la suramina, bloqueantes de los canales de Na^+ neuronales dependientes de voltaje y de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos, receptores adrenérgicos α y β y purinérgicos P2, respectivamente, sugiriendo así, su carácter miogénico (Andersson, 1992; Imai et al., 2002). Sin embargo, son sensibles a los bloqueantes de los canales VOC tipo L y a los activadores de los canales de K^+ (Andersson & Arner, 2004).

Las contracciones fásicas espontáneas miogénicas en el músculo detrusor son moduladas por el urotelio. Así, preparaciones desprovistas de urotelio muestran actividad espontánea incrementada con respecto a las preparaciones con urotelio intacto (Buckner et al., 2002). La amplitud de las contracciones espontáneas es dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo L y de la liberación de Ca^{2+} desde el RS. Asimismo, la vía de la Rho-cinasa y los canales de K^+ de la membrana están involucrados en dichas respuestas (Wibberley et al., 2003). De hecho, la inhibición de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} incrementa la amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas, indicando así, que dichos canales son críticos en la regulación de la actividad fásica espontánea. La inhibición de los canales K_{ATP} , no altera las contracciones miogénicas, sin embargo, activadores de dichos canales suprimen la actividad espontánea. Además, los canales K_v regulan la contracción rítmica miogénica, indicando así, que la modulación de dichos canales es una estrategia terapéutica eficaz en la hiperactividad vesical (Andersson & Arner, 2004).

La obstrucción del flujo de salida vesical está asociada con la hiperactividad del detrusor, ya que dicha disfuncionalidad se caracteriza por cambios morfológicos de la pared de la vejiga como son la denervación progresiva y la hipertrofia de la misma (Gosling et al., 2000). Un incremento en la tensión de la vejiga, como sucede en la obstrucción, se ha asociado con alteraciones celulares y moleculares (función mitocondrial, enzimas musculares, etc.). De hecho, se ha sugerido que la hiperactividad del detrusor podría ser consecuencia de la denervación de la pared vesical que alteraría la transmisión de la excitación célula a célula (Turner & Brading,

1997). Así, en los cuadros obstructivos se producen cambios en las propiedades eléctricas de la membrana consistentes en la reducción en los valores del potencial de membrana y en la actividad eléctrica producida espontáneamente. Además, la actividad miogénica puede estar incrementada en situaciones en las cuales la actividad aferente se encuentre exacerbada, contribuyendo así a la hiperactividad del detrusor (Kinder & Mundy, 1987).

La unidad pieloureteral tiene una actividad miogénica generada por las células marcapasos (Lang & Zhang, 1996). La conducción iónica que subyace a la actividad de dicho marcapasos es debida a la apertura y el cierre lento de los canales VOC tipo L, la cual, es amplificada por los prostanoïdes (Santicioli et al., 1995)) y modulada por la activación de los canales de K_{Ca} y K_v (Lang et al., 2006).

1.4.9. Células intersticiales

En el Tracto Urinario se ha descrito la presencia de las denominadas "*Células Intersticiales de Cajal*" (CIC), generadoras de los potenciales de acción lentos, que determinan la frecuencia y características de las contracciones fásicas. Dichos potenciales se generan de forma autónoma y se propagan al músculo liso. Dado que las CIC se encuentran acopladas eléctricamente a las células de la musculatura lisa, no es fácil, en ocasiones distinguir si un determinado efecto farmacológico está asociado a un tipo u otro de células. De ahí, la importancia de demostrar receptores específicos en las células intersticiales de Cajal. El único receptor que se ha encontrado en las CIC es el receptor tirosina cinasa (*C-kit*). La proteína *C-kit* es un receptor que promueve la migración y la proliferación celular, siendo esencial para el desarrollo de la actividad marcapasos y el peristaltismo ureteral (Lang et al., 2006). En el uréter humano se han identificado CIC a nivel del plexo de la innervación muscular de tercer orden (Metzger et al., 2004). Dichas células, adaptando formas polipoideas, fusiformes o triangulares, se encuentran localizadas en los puntos de entrecruzamiento de las neurofibrillas de la formación vegetativa terminal. A semejanza del Tracto Intestinal, las CIC, pueden encontrarse en el músculo liso y en la submucosa del uréter (Metzger et al., 2005; Lang et al., 2007).

En la vejiga de cobaya y de hombre se ha descrito la existencia de células fusiformes que se localizan, de forma numerosa, en los haces musculares y en el

interior del intersticio de la pared vesical, estando especialmente concentradas en la vaina fibromuscular externa donde constituyen una densa red interconectada (Smet et al., 1996). Asimismo, células reactivas a la proteína *c-kit*, similares a las CIC, están localizadas en paralelo con las células musculares lisas, pudiendo actuar como marcapasos y/o como intermediarios en la transmisión de señales nerviosas a las células musculares lisas (McCloskey & Gurney, 2002). Así, esta red de células intersticiales suburoteliales de la vejiga humana desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular al actuar como un *sinticio funcional* a través de la integración de una amplia variedad de señales sensoriales y motoras de la pared de la vejiga (McCloskey, 2011). La extensa red de células fibroblásticas estrelladas en el detrusor humano están localizadas periféricamente en los haces musculares en íntimo contacto con nervios aferentes y eferentes desempeñando un importante papel en la secreción y el mantenimiento del material extracelular, pudiendo además actuar como receptores para el estiramiento de la pared vesical (Drake et al., 2003). No obstante, se desconoce si dichas células representan una o varias poblaciones celulares, así como, la funcionalidad específica de las mismas. Las señales del urotelio son importantes tanto para el desarrollo y la funcionalidad del detrusor (Baskin et al., 2001). De hecho, la liberación de un factor relajante desde el urotelio, el cual, desempeña un papel importante en la relajación de la vejiga durante la fase de llenado, sugiere que las células intersticiales representen una vía de comunicación directa entre el urotelio y el detrusor (Hawthorn et al., 2000; Kanai & Andersson, 2010).

1.5. CONTROL NERVIOSO Y HORMONAL

1.5.1. Mecanismos colinérgicos

Las terminaciones nerviosas parasimpáticas liberan ACh, la cual activa diferentes receptores muscarínicos de las células musculares lisas del uréter y de la vejiga urinaria. La contracción de la vejiga es producida por la ACh y mediadores no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) como el ATP (Burnstock, 1972; Ochodnický et al., 2013b).

1.5.1.1. *Receptores muscarínicos*

Se han identificado 5 subtipos de receptores muscarínicos: M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5 . Dichos receptores están acoplados a proteínas G, pero la señal de transducción varía dependiendo si la subunidad del receptor es par o impar. Así, los receptores muscarínicos de subíndice impar (M_1 , M_3 y M_5) están acoplados a la subunidad $G_{q/11}$ de las proteínas G, asociada a la fosforilación de los fosfatidilinosítoles produciendo, en última instancia, la movilización de Ca^{2+} desde el RS. Sin embargo, los receptores muscarínicos M_2 y M_4 están acoplados a la subunidad $G_{i/o}$ de las proteínas G sensible a la toxina pertusis, que produce la inhibición de la adenilato ciclasa (Figura XI) (Andersson & Arner, 2004).

Se ha descrito la presencia y funcionalidad de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 y M_4) en el uréter intravesical del cerdo y del hombre, en donde la inervación colinérgica es especialmente numerosa (Hernández et al., 1993; Prieto et al., 1994). Los agonistas colinérgicos (ACh, metacolina, carbacol y betanecol) tienen un efecto excitador sobre la función del uréter y de la pelvis renal, aumentando la frecuencia y la fuerza de la contracción (Ichikawa & Ikeda, 1960). La acción excitadora inducida por el carbacol en el uréter de perro es mediada a través de los receptores M_3 , los cuales, están acoplados a la activación de la fosfolipasa C y consecuente formación de segundos mensajeros (IP_3 y DAG) (Tomiya et al., 2003b).

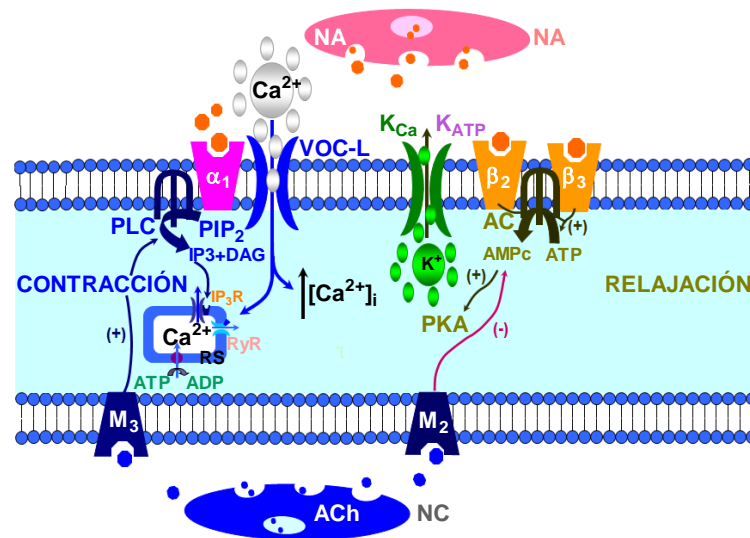


Figura XI **Mecanismos de señalización de los receptores adrenérgicos y colinérgicos.** La relajación mediada por receptores adrenérgicos β es producida vía activación de la adenilato ciclasa (AC) con el consecuente aumento de la $[AMPc]_i$ que produce fosforilación de la proteína cinasa A (PKA) e hiperpolarización por la activación de canales BK_{Ca} y K_{ATP} . La contracción mediada por receptores adrenérgicos α_1 es producida por la hidrólisis del PIP_2 , dando lugar a la formación de IP_3 y DAG, este último implicado en la sensibilización de la maquinaria contráctil. El IP_3 se une al RyR en la membrana del RS causando la liberación de Ca^{2+} desde el RS y el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L, incrementando la $[Ca^{2+}]_i$ y produciendo la consecuente contracción muscular. Los receptores M_3 , al igual que los receptores adrenérgicos α_1 , están acoplados a la hidrólisis de los fosfatidilinosoles, promoviendo así, una contracción directa del músculo. Sin embargo, los receptores muscarínicos M_2 inducen una contracción indirecta ya que están acoplados a la inhibición de la AC impidiendo la relajación mediada a través de receptores adrenérgicos β . Adaptación de (Hernández & Bustamante,2010).

En la vejiga humana se ha demostrado la existencia de ARNm para todos los subtipos de receptores muscarínicos siendo predominantes los ARNm de los receptores M_2 y M_3 (Sigala et al., 2002). En el detrusor aislado de cobaya, conejo y del hombre, la ACh produce una ligera despolarización, la cual inicia la generación de espigas e incrementa la frecuencia de los potenciales de acción produciendo, finalmente, la contracción muscular (Andersson et al., 1991). En dicha contracción se ha demostrado la implicación de los canales catiónicos no selectivos y de las dos isoformas de la Rho-cinasa (I y II) (Jezior et al., 2001; Wibberley et al., 2003). En el detrusor humano, la contracción colinérgica es producida a través la fosforilación de los fosfatidilinosoles de la membrana celular (Andersson et al., 1991). Sin embargo, la

ACh, liberada desde los nervios, no es suficiente para provocar la formación de IP_3 (Iacovou et al., 1990). De hecho, receptores de subíndice impar, los cuales, estimulan la producción de IP_3 , necesitan altas concentraciones de agonista para ejercer su funcionalidad, mientras que los receptores muscarínicos de subíndice par, que no producen IP_3 , operan a bajas concentraciones (Hashitani et al., 2000). El mecanismo de señalización de estos últimos estaría relacionado con la inhibición de la relajación simpática producida por los receptores adrenérgicos β a través del bloqueo de la adenilato ciclasa (Hegde, 2006). Además, los receptores muscarínicos M_2 pueden modular la relajación producida por las purinas (Giglio et al., 2001), activar canales catiónicos no específicos o inhibir la hiperpolarización producida por la PKC a través de la activación de los canales K_{ATP} en la vejiga urinaria (Bonev & Nelson, 1993). En la vejiga humana, el receptor muscarínico M_2 es el mayoritario, sin embargo, el receptor funcionalmente activo es el receptor M_3 (Chapple et al., 2002). De hecho, el carbacol induce una corriente transitoria de salida de Ca^{2+} desde el RS (*sparks*), produciendo la activación de los canales BK_{Ca} , los cuales, a su vez, son inhibidos por receptores M_2 acoplados a la subunidad inhibidora de las proteínas G (G_i) (Nakamura et al., 2002). Esto explicaría que la vía de señalización intracelular acoplada a la activación del receptor muscarínico M_2 , potencie la contracción colinérgica mediada a través de los receptores M_3 . Por tanto, los receptores muscarínicos M_3 son los principales responsables de la contracción de la vejiga sana (Chess-Williams, 2002) y obstruida (Krichevsky et al., 1999), mientras que los receptores muscarínicos M_2 , que en condiciones normales median contracciones moderadas, incrementan su funcionalidad cuando la contracción muscarínica M_3 está disminuida, como sucede en la denervación y en la hipertrofia de la vejiga urinaria (Braverman et al., 2006).

1.5.2. Mecanismos adrenérgicos

El papel del Sistema Nervioso Simpático (SNS) en la función de la vejiga humana ha sido bastante discutido debido a la escasa innervación adrenérgica existente en el detrusor humano (Gosling et al., 1986). Sin embargo, el SNS modula la actividad ureteral (Latifpour et al., 1990). De hecho, se ha identificado la presencia y funcionalidad de neuronas catecolaminérgicas en el cáliz renal (Longrigg, 1974) y en el uréter (Edyvane et al., 1994). El uréter posee receptores adrenérgicos α y β , contráctiles

y relajantes, respectivamente (McLeod et al., 1973; Rose & Gillenwater, 1974; Latifpour et al., 1990).

1.5.2.1. Receptores adrenérgicos α

En los años 70, los receptores α y β adrenérgicos fueron los primeros en ser descritos en el uréter humano (Malin et al., 1970) siendo los receptores α_{1A} y α_{1D} los subtipos predominantes (Sigala et al., 2005). Al igual que los receptores muscarínicos de subíndice impar, la activación de los receptores adrenérgicos α_1 produce la contracción de la musculatura lisa ureteral a través de la vía PLC/IP₃/DAG. La NA aumenta la actividad peristáltica y el tono ureteral a través de la activación de dichos receptores (Hernández et al., 1992; Richardson et al., 1997). El antagonista de los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1D} , tamsulosina es de utilidad en la terapia farmacológica de la hiperplasia benigna de próstata (HBP) (Hutchison et al., 2007) y en la litiasis ureteral distal aguda (Dellabella et al., 2003).

Los agonistas de los receptores adrenérgicos α_{1A} producen contracción del detrusor en la mayoría de las especies (Andersson & Arner, 2004). En las vejigas sanas, la expresión del ARNm de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} , y α_{1D} , β_1 y β_2 está reducida mientras que la del receptor β_3 está incrementada. En vejigas obstruidas, por el contrario, la expresión de los receptores α_{1A} y α_{1D} está incrementada, mientras que la expresión de los receptores α_{1B} está disminuida, lo cual, podría explicar que los antagonistas adrenérgicos α_{1A} mejoren notablemente la obstrucción del flujo de salida (Restorick & Mundy, 1989). Asimismo, existe una relación entre la expresión de ARNm del receptor α_{1D} en la mucosa vesical y las alteraciones urodinámicas características de pacientes con HBP (Kurizaki et al., 2011). Los cambios en la densidad y en la expresión de receptores α_1 están relacionados con la hiperactividad del detrusor asociada a la obstrucción del flujo de salida y al daño neurogénico (Perlberg & Caine, 1982). De hecho, en la obstrucción del flujo de salida el balance entre la contracción, mediada por los receptores adrenérgicos α , y la relajación, a través de los receptores β , puede ser modificada por la baja regulación de estos últimos (Rohner et al., 1978). En pacientes con HBP, el uso de antagonistas adrenérgicos α_1 mejora la hiperactividad del detrusor, sugiriendo que puede existir un incremento de la función del receptor α_1 asociada con cambios morfológicos ocurridos durante la HBP. Por tanto, el grado y la duración de la

obstrucción tienen un papel importante en las respuestas mediadas por los receptores adrenérgicos α (Andersson & Arner, 2004).

1.5.2.2. *Receptores adrenérgicos β*

Los agonistas adrenérgicos β estimulan la AC incrementando el AMPc intracelular, y éste a su vez activa la PKA para mediar sus efectos biológicos (Andersson & Arner, 2004). En dicha relajación, parece desempeñar un papel importante la hiperpolarización producida por la activación de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana celular (Nakahira et al., 2001). Canales BK_{Ca} y K_{ATP} están involucrados en la relajación producida por la estimulación de los receptores adrenérgicos β_2 en la vejiga urinaria de cobaya (Hudman et al., 2000). Sin embargo, el papel de los receptores adrenérgicos β es cuestionado ya que su bloqueo no tiene efecto sobre la función del detrusor humano normal (Andersson & Arner, 2004).

En el músculo liso del uréter humano, se expresan los receptores β_2 y β_3 que median la relajación ureteral (Park et al., 2000). En el uréter de rata, el KUL-7211, agonista β receptor, indujo relajación ureteral por activación de los receptores adrenérgicos β_2 y β_3 (Tomiya et al., 2003a). En el uréter obstruido de conejo (Miyatake et al., 2001) y perro (Murakami et al., 2000), la estimulación de los receptores β_3 disminuye la presión ureteral por encima del cálculo, promoviendo la relajación del músculo liso en aras a facilitar la expulsión del mismo. Existe una abundante expresión de receptores adrenérgicos β en el detrusor de diferentes especies animales, los cuales, desempeñan un papel fundamental en la relajación de la pared vesical durante la fase de llenado (Michel & Vrydag, 2006; Michel, 2011). El predominio de los receptores adrenérgicos β con respecto a los receptores α explicaría la relajación producida por la NA en el detrusor, responsable del llenado de la vejiga urinaria (Perlberg & Caine, 1982). El subtipo de receptor β que media esta relajación varía con la especie; β_2 en el conejo (Morita et al., 2000) y ratón (Wuest et al., 2009), β_2 y β_3 en la rata (Longhurst & Levendusky, 1999) y el cerdo (Yamanishi et al., 2002) y β_2 y principalmente β_3 en el perro y en el hombre (Takeda et al., 1999; Yamanishi et al., 2002; Wuest et al., 2009). Los agonistas de estos receptores producen la relajación del músculo liso de la vejiga urinaria a través de su efecto directo sobre los receptores β_3 de los miocitos del detrusor. Los agonistas selectivos de los receptores β_2 median la relajación del detrusor humano (Badawi et al., 2007) y los agonistas no selectivos de los receptores β , como el

isoproterenol, producen una relajación mayor que la producida por los agonistas selectivos β_3 (Igawa et al., 2001; Kullmann et al., 2009). Los tres tipos de receptores β , además de estar expresados en las células del músculo liso, están presentes en el urotelio, en las células miofibroblásticas del suburotelio, en las células ganglionares intramurales y en las células de Schwann de nervios de la vejiga de diferentes especies, como la rata (Kullmann et al., 2009), el cerdo (Masunaga et al., 2010) y el hombre (Otsuka et al., 2008).

En las vejigas sanas, la expresión del ARNm de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 está reducida mientras que la del receptor β_3 está incrementada. En vejigas con patología obstructiva, la expresión de los receptores β_1 y β_2 está aumentada, mientras la expresión de los receptores β_3 está disminuida (Restorick & Mundy, 1989). Además, la relajación inducida por los agonistas selectivos de los receptores β_3 es efectiva en diferentes modelos animales con hiperactividad vesical (Igawa et al., 1999). Sin embargo, la efectividad de dichos agonistas en la hiperactividad del detrusor en el hombre es limitada. Podría, por tanto, sugerirse que la hiperactividad del detrusor es consecuencia de la ausencia de relajación mediada por los receptores adrenérgicos β , aunque no existan diferencias significativas en la densidad de dichos receptores en vejigas normales y con hiperactividad detrusoriana (Restorick & Mundy, 1989).

1.5.3. Mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos (NANC)

En la mayoría de las especies parte de la contracción neurogénica de la vejiga es resistente a la atropina. Así, en la vejiga de la rata, el componente fásico de la contracción en respuesta a la estimulación eléctrica transmural (EET), es producida por la liberación de un neurotransmisor NANC (Andersson & Arner, 2004). Asimismo, la implicación de mecanismos NANC excitadores e inhibidores en el control de la tensión de la musculatura lisa del uréter ha sido documentada (Edyvane et al., 1994; Kumar et al., 2004). La contribución de los mecanismos NANC en la regulación de la tensión varía con la especie, siendo su implicación controvertida en la vejiga humana (Andersson, 2002), en donde el componente colinérgico representa aproximadamente un 50% de la neurotransmisión excitadora (Bayliss et al., 1999). En pacientes con hiperactividad del detrusor, el componente NANC excitador se incrementa en gran medida (Andersson & Arner, 2004).

1.5.3.1. Sistema purinérgico

El ATP y las purinas relacionadas, el ADP y la adenosina, actúan como moléculas señalizadoras que median sus acciones biológicas al menos a través de dos clases principales de receptores de membrana denominados receptores purinérgicos P2 y P1 (Burnstock et al., 1978). El ATP y el ADP actúan a través de los receptores P2, los cuales, a su vez se subdividen en receptores P2X (7 subtipos: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ y P2X₇) y P2Y (8 subtipos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, y P2Y₁₄). Los receptores P2X son receptores inotrópicos cuya activación provoca una entrada rápida de Ca²⁺, mientras que los receptores P2Y están asociados a proteínas G_(q/11). La adenosina se conjuga, por su parte, con 4 subtipos de receptores P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B}, y A₃) acoplados a proteínas G (Burnstock, 2011).

El ATP desempeña un papel esencial como neurotransmisor excitador en el Tracto Urinario Inferior (Burnstock, 2001). De hecho, en la vejiga de varias especies, el componente excitador resistente a la atropina es debido a la liberación de ATP actuando a través de los receptores P2X localizados en el detrusor (Burnstock et al., 1978). El ATP se libera conjuntamente con la ACh en respuesta a la estimulación nerviosa, y durante la fase de activación parasimpática, la contracción inicial del detrusor sería debida a la liberación de ATP desde los nervios, mientras que la ACh continuaría y finalizaría dicha contracción produciendo el vaciado completo de la vejiga urinaria (Burnstock, 2013). Asimismo, en el uréter se han identificado la existencia de receptores purinérgicos (Lee et al., 2000) y la liberación de ATP desde el urotelio en respuesta a la distensión ureteral (Knight et al., 2002), estimula las terminaciones aferentes al interactuar con múltiples receptores purinérgicos (Rong & Burnstock, 2004). Se han identificado dos clases de fibras aferentes mecanosensibles en el uréter, unas corresponden a sensores de tensión que responden al peristaltismo ureteral, mientras que las otras están implicadas en el señalización de alteraciones como el enclavamiento de cálculos renales y el aumento de las presiones intraluminales (Cervero & Sann, 1989). En respuesta a la distensión ureteral, el ATP, vía activación de los receptores purinérgicos P2X₃ uroteliales, es el mediador responsable del dolor y de la contracción ureteral (Knight et al., 2002; Rong & Burnstock, 2004; Calvert et al., 2008). La administración intravesical de ATP produce la activación aferente de la vejiga mediada esencialmente a través de fibras C insensibles a capsaicina (Aizawa et al., 2011). El ATP actúa en los receptores P2X₃ presentes en las neuronas aferentes de la

capa suburotelial modulando la respuesta aferente del SNC, modificando así, el volumen vesical (Burnstock, 2013). Asimismo, otros estímulos como el pH ácido, producen la liberación de ATP, indicando así, que la acidez de la orina desempeña un papel importante en la contractilidad de la pared vesical (Sadananda et al., 2011).

La activación del detrusor por el ATP es producida vía activación de canal catiónico acoplado a ligando (receptor P2X) que promueve el influjo de Ca^{2+} extracelular. En la vejiga del conejo, la respuesta al ATP es bifásica, pero después de la desensibilización con α, β met-ATP, agonista de los receptores purinérgicos P2X_1 , dicha respuesta es monofásica apuntando, así, la implicación de dos subtipos de receptores purinérgicos (Burnstock, 2011). La contracción de ATP en el detrusor del hombre es producida principalmente vía activación de los receptores P2X_1 . No obstante, los receptores P2X_4 y P2X_7 también están presentes en el detrusor aunque su funcionalidad es limitada (O'Reilly et al., 2001). En vejigas hiperactivas existe una sobreexpresión en la expresión de los receptores purinérgicos P2X (Moore et al., 2001). La transmisión purinérgica anómala podría explicar el cuadro sintomatológico de dichos pacientes, sugiriendo así, un papel más determinante del ATP en vejigas obstruidas e hiperactivas (O'Reilly et al., 2001; Harvey et al., 2002). Estos autores confirmaron que el receptor purinérgico P2X_1 era el receptor predominante en el detrusor humano, incrementando su densidad en cuadros obstructivos. De hecho, en los primeros estadios de cuadros obstructivos, la contracción purinérgica está aumentada mientras que la colinérgica está disminuida (Calvert et al., 2008).

En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo, el ATP está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC produciendo relajación a través de la activación de receptores purinérgicos $\text{A}_{2\text{A}}$ tras su hidrólisis a adenosina y de receptores P2Y_1 después de su metabolización a ADP (Hernández et al., 2009). La adenosina provoca una relajación del uréter intravesical del cerdo independiente de prostanoïdes y/o de NO, vía activación de los receptores $\text{A}_{2\text{B}}$, localizados en el músculo liso (Hernández et al., 1999).

1.5.3.2. *Neurotransmisores gaseosos*

1.5.3.2.1. Óxido nítrico (NO)

El NO es el principal neurotransmisor inhibidor NANC en el Tracto Urinario Inferior (Andersson & Arner, 2004). La expresión de las tres isoformas de la enzima de síntesis de NO (NOS), dos constitutivas: la NOS neuronal (NOS_n) y NOS endotelial (NOS_e) y una isoforma inducible (NOS_i), fue demostrada en el músculo liso del Tracto Urinario Inferior de diversas especies incluido el hombre (Ehren et al., 1994; Lemack et al., 2000; Johansson et al., 2002; Felsen et al., 2003).

En el uréter del hombre se expresa la NOS neuronal, particularmente en los segmentos distales, la cual, desempeña un papel fundamental en la motilidad de la unión uréterovesical (Stief et al., 1996). Asimismo, la presencia y funcionalidad de la NOS_n ha sido demostrada en el uréter intravesical, en donde el NO desempeña un papel esencial en la neurotransmisión inhibidora NANC (Hernández et al., 1995b). En el uréter proximal, sin embargo, el NO, liberado desde el urotelio, modula las contracciones ureterales (Mastrangelo et al., 2003). La expresión de las tres isoformas de la enzima de síntesis de NO en el interior del urotelio, sugiere un papel importante del NO, en las diferentes especies incluido el hombre, en el control de la contractilidad vesical a través de la inhibición de la actividad nerviosa aferente (Dokita et al., 1994). Aunque no hay evidencia de que la NOS_n sea producida en células musculares del detrusor (Elliott & Castleden, 1993) se ha sugerido que el NO podría estar implicado en la relajación de la pared vesical durante la fase de llenado (James et al., 1993). Si el NO juega un papel relevante cabría esperar un papel importante del GMPc, sin embargo, el GMPc únicamente está relacionado con la relajación de la uretra, mientras que el AMPc sería el nucleótido responsable de la relajación del detrusor (Morita et al., 1992). En esta línea, Masuda y col demostraron que en el detrusor, a diferencia de la uretra, la actividad de la NOS y de la guanilato ciclasa era detectada en la mucosa y no en el músculo liso (Masuda et al., 2002). Los donantes de NO producen relajación del detrusor, sugiriendo así, la implicación de la vía de la PKG, la cual, a través de la desensibilización de la maquinaria contráctil al Ca²⁺ y de la activación de canales BK_{Ca}, produce la relajación muscular (Hofmann et al., 2000) Por tanto, no parece probable que el NO actúe como neurotransmisor inhibidor produciendo la relajación del detrusor, sin embargo, puede modular el efecto de otros neurotransmisores o desempeñar un papel significativo en la transmisión aferente, ya que cambios en la

actividad de la NOS_i pueden favorecer el desarrollo de la hipertrofia de la pared de la vejiga. De hecho, en la obstrucción del flujo de salida se incrementa la actividad de la NOS_i y disminuye la de la NOS_n (Felsen et al., 2003). El NO, derivado de la NOS_i, producido en las patologías urinarias obstructivas, favorece la generación de contracciones espontáneas de la vejiga y produce fibrosis de la pared vesical, lo cual, sugiere que los inhibidores de la NOS_i puedan tener una posible utilidad terapéutica (Felsen et al., 2003).

A diferencia del detrusor, en el cuello de la vejiga urinaria del hombre y del cerdo, el NO, cuya liberación es modulada por los canales K_v y por los receptores adrenérgicos α_2 de localización presináptica, está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC, produciendo relajación muscular a través de mecanismos dependientes de la guanilato ciclasa (Hernández et al., 2007; Hernández et al., 2008; Bustamante et al., 2010). Así, el NO, liberado durante la fase de activación parasimpática, produce la relajación de la base de la vejiga, facilitando así, el vaciado completo de la misma.

1.5.3.2.2. Sulfuro de hidrógeno (H₂S)

El H₂S es considerado el tercer gas neurotransmisor junto con el NO y el monóxido de carbono (CO) y desempeña una amplia variedad de acciones biológicas en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. De hecho, el H₂S está involucrado en la modulación de la actividad neuronal, en la relajación del músculo liso, en la regulación de la liberación de la insulina, en la inducción de la angiogénesis y como antiinflamatorio en el SN (Wang et al., 2012), el Sistema Cardiovascular (Zhao et al., 2003), el Sistema Reproductor (Teague et al., 2002) y el Sistema Digestivo (Teague et al., 2002; Fiorucci et al., 2006).

La síntesis de H₂S puede producirse a través de dos vías, una enzimática y otra no enzimática. La síntesis enzimática del H₂S, a partir de la L-cisteína, involucra la participación de tres enzimas denominadas: cistationina γ -liasa (CSE), cistationina β -sintasa (CBS) y 3-mercaptopiruvatosulfuro transferasa (3-MST) (Kolluru et al., 2013). La CBS predomina en el cerebro, SN y en el hígado, mientras que la CSE es más abundante en el Sistema Cardiovascular y la 3-MST ha sido identificada en el cerebro y en los vasos sanguíneos (Moore et al., 2003; Bhatia, 2005). Mientras la CBS y la CSE son hemoproteínas localizadas en el citoplasma, 3-MST es una proteína dependiente de

zinc localizada en la mitocondria y en el citoplasma. La CSE y la CBS producen H_2S , a partir de la L-cisteína, a través de una reacción que involucra la generación de piruvato y amonio. Asimismo, la 3-MST da lugar a la formación de H_2S , vía reacción que genera piruvato y 3 mercaptopiruvato (Shibuya & Kimura, 2013). Junto con la producción enzimática de H_2S , se ha identificado una generación de H_2S a través de vías no enzimáticas escasamente conocidas. La producción no enzimática de H_2S se produce a partir de glucosa, glutatión, polisulfitos orgánicos e inorgánicos y azufre. El H_2S se genera a partir de glucosa vía glicolisis o a partir fosfogluconato por activación de la NADPH oxidasa. El H_2S es también producido a través de la reducción directa de glutatión y azufre (Kolluru et al., 2013).

El H_2S produce relajación del músculo liso vía de forma directa y/o indirecta e inhibe las contracciones por actividad peristáltica o inducidas por la EET (Teague et al., 2002). En la vejiga urinaria de rata, los donantes de H_2S producen la contracción del detrusor por mecanismos indirectos a través de la estimulación de las fibras aferentes primarias sensibles a capsaicina (APSC) (Patacchini et al., 2005). Recientemente, se ha desvelado la existencia de una rica inmunoreactividad para la enzima de síntesis del H_2S , la CSE y moderada para la CBS, en la capa muscular del cuello vesical del cerdo, sugiriendo así, un importante papel en la neurotransmisión inhibidora NANC no nitrérgica del cuello de la vejiga urinaria (Fernandes et al., 2013b). El H_2S produce la relajación de la musculatura lisa del cuello vesical vía activación de canales K_{ATP} , e indirectamente a través de la liberación de los neuropéptidos inhibidores, PACAP 38 y CGRP, y prostanoïdes derivados de la COX-1 desde las APSC vía activación de los canales catiónicos TRPV₁ y TRPA₁ (Fernandes et al., 2013a).

1.5.3.3. Neuropéptidos

Los neuropéptidos son sintetizados, almacenados y liberados en el Tracto Urinario de diferentes especies incluido el hombre, desempeñando un papel esencial como moléculas neurotransmisoras y neuromoduladoras (Andersson & Arner, 2004). En el uréter, la liberación de las taquicininas y del CGRP desde las APSC originan un incremento y una reducción, respectivamente, de la actividad peristáltica (Hua & Lundberg, 1986). Asimismo, en el detrusor humano, péptidos como el PACAP, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el CGRP, las taquicininas, las angiotensinas y las

endotelinas, están implicados en la regulación de la tensión de la musculatura lisa (Andersson & Arner, 2004).

1.5.3.3.1. Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Los péptidos como el PACAP, con sus dos isoformas PACAP 38 y PACAP 27, y el VIP están ampliamente expresados en neuronas del Tracto Urinario Inferior. Así, inmunorreactividad para el VIP ha sido demostrada en neuronas aferentes y eferentes que inervan la vejiga y la uretra, mientras que inmunorreactividad para el PACAP está presente únicamente en las neuronas aferentes (Yoshiyama & de Groat, 2008). Ambos neuropéptidos se unen a tres subtipos de receptores denominados: PAC₁ (específico de PACAP), VPAC₁ y VPAC₂ (que muestran similar afinidad por el VIP y el PACAP), los cuales, están acoplados a la subunidad G_s de las proteínas G. Dichos receptores han sido identificados en la musculatura lisa de la vejiga urinaria de varias especies incluido el hombre (Reubi, 2000). La activación de los tres subtipos de receptores, estimula a la AC con el consecuente incremento en la producción de AMPc (Sherwood et al., 2000; Laburthe et al., 2002). Los receptores PAC₁ están presentes en el músculo liso y en el urotelio, mientras que los receptores VPAC₂ únicamente se expresan en la capa muscular de la vejiga de la rata (Braas et al., 2006). Los receptores VPAC₁ han sido identificados en el epitelio de la uretra del ratón (Harmar, 2004).

El VIP y el PACAP relajan el uréter intravesical del cerdo a través de receptores neuronales y musculares (Hernández et al., 2004). Asimismo, se ha demostrado la existencia de receptores neuronales VPAC₁ y VPAC₂ en el uréter humano (Edyvane et al., 1992). Asimismo, el VIP relaja el detrusor, el cuello vesical y la uretra de diferentes especies incluido el hombre (Hernández et al., 2006; Hernández et al., 2007; Yoshiyama & de Groat, 2008). El PACAP relaja la vejiga y la uretra de especies como el cerdo, pero produce contracción del músculo liso de otras, como el ratón. Este efecto puede ser debido a que este péptido produce acciones facilitadoras presinápticas y efectos excitadores sobre neuronas preganglionares parasimpáticas lumbosacras. De hecho, el PACAP desempeña un papel relevante en la contracción del detrusor, al facilitar la liberación del ATP desde el urotelio, contribuyendo, así, a la hipersensibilidad y a la hiperactividad del detrusor característica del síndrome inflamatorio crónico vesical (cistitis intersticial) (Girard et al., 2008; Yoshiyama & de Groat, 2008). Los niveles

plasmáticos bajos de VIP y/o PACAP pueden provocar la disfuncionalidad motora de la vejiga urinaria, por lo que una disminución de la expresión de VIP puede estar relacionada con algunas formas de hiperactividad del detrusor, como la hiperactividad idiopática (Chapple, 2010) o neurogénica (Kinder et al., 1985) del detrusor. Además, ratones *Knockout* para PACAP presentan una capacidad vesical, un volumen de vaciado y un intervalo de contracción detrusoriana incrementadas, así como una estimulación somática disminuida, sugiriendo así, que un déficit en la expresión de PACAP estaría relacionado con la disfuncionalidad somática y visceral vesical (May & Vizzard, 2010). Ambos neuropéptidos participan en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria del cerdo produciendo relajación del mismo a través de los receptores musculares VPAC₂. Además, receptores facilitadores PAC₁ (localizados en las APSC y acoplados a la liberación de NO) y receptores VPAC inhibidores (presentes en las terminaciones motoras) están involucrados en las relajaciones inducidas por el PACAP 38 y el VIP, respectivamente (Hernández et al., 2006; Hernández et al., 2007).

1.5.3.3.2. Taquicinas (TKs)

Las TKs, constituyen una familia de péptidos integrada por la sustancia P (SP), la neurocinina A (NKA) y la neurocinina B (NKB), las cuales, están presentes en las APSC de la vejiga urinaria de varias especies incluido el hombre. Se han caracterizado genómica y farmacológicamente, tres subtipos de receptores taquicinérgicos: receptores NK₁, NK₂ y NK₃, los cuales, están acoplados a proteínas G. La SP, la NKA y la NKB actúan sobre los tres subtipos de receptores, aunque con diferentes afinidades. La SP se conjuga esencialmente con el receptor NK₁, la NKA con el receptor NK₂ y la NKB se acopla preferencialmente a los dos subtipos de receptores NK₃ (NK_{3A} y NK_{3B}) (Lecci & Maggi, 2001, 2003). Todos los subtipos de receptores han sido identificados en el uréter y la vejiga urinaria de varias especies, siendo el receptor NK₂ el receptor funcionalmente activo que produce contracción del músculo liso por la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales VOC tipo L y, en menor medida, por la movilización de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares (Burcher et al., 2000).

En el Tracto Urinario, las TKs coexisten con el CGRP, el PACAP y los aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato en las APSC (Bustamante et al., 2000; Bustamante et al., 2001; Avelino & Cruz, 2006). Además, la expresión de las TKs en otro tipo de neuronas resistentes a la capsaicina puede ocurrir en condiciones

fisiopatológicas, tales como en la cistitis ya que, junto con su función aferente, la liberación periférica de estos péptidos estimula la contractilidad del detrusor por inducir la denominada *inflamación neurogénica* (Lecci & Maggi, 2003). Las TKs causan la contracción directa del uréter intravesical del cerdo (Bustamante et al., 2001) y del hombre (Nakada et al., 2001) vía activación de los receptores NK₂.

1.5.3.3.3. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

El CGRP coexiste con el PACAP en las APSC del uréter, trigono y uretra de la rata (Fahrenkrug & Hannibal, 1998). El CGRP se libera desde las APSC en respuesta a la estimulación de BK y/o prostaglandinas (Vasko et al., 1994), endotelinas (Dymshitz & Vasko, 1994) y por la activación del SNP (Kawasaki et al., 1990). Las APSC expresan el receptor TRPV₁ (Wardle et al., 1997), cuya activación origina la liberación del CGRP, la SP, la NKA y la NKB desde las APSC (Sasamura & Kuraishi, 1999).

El uréter de los mamíferos recibe una rica innervación sensorial peptidérgica. Un 91% de las fibras aferentes que recibe el uréter de cobaya son APSC (Maggi et al., 1995). Dichas fibras participan en la modulación local de la motilidad ureteral a través de la liberación del CGRP (Hua & Lundberg, 1986), el cual, actúa como neurotransmisor inhibitorio en el uréter de la rata y de cobaya relajando el músculo liso a través de un mecanismo dependiente de la AC con el consecuente incremento de la [AMPc]_i e hiperpolarización por apertura de canales de K⁺ de membrana (Santicioli & Maggi, 1998). Debido a su papel clave como regulador de la excitabilidad ureteral, podría tener una alta eficacia terapéutica en la eliminación de ondas antiperistálticas características de procesos obstructivos ureterales (Maggi et al., 1995). En la vejiga, también es característica la presencia de una rica innervación de APSC conteniendo CGRP, el cual, produce la relajación del detrusor de cordero (Tucci et al., 2002). Asimismo, una potente acción inhibitoria del CGRP y de la capsaicina ha sido demostrada en el detrusor de cobaya, revelando así, la presencia de reflejos locales en la actividad de la vejiga, en donde los axones colaterales de las fibras sensoriales modulan el mecanismo marcapasos de la pared vesical responsable de las contracciones fásicas del detrusor (Gillespie, 2005). No obstante, el CGRP tiene escasa repercusión funcional en el detrusor del cerdo (Persson et al., 1991) y del hombre (Uckert et al., 2002). En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo se ha desvelado la existencia de una rica densidad de innervación conteniendo elementos

inmunorreactivos al CGRP que penetran a través de la serosa y se distribuyen en la capa muscular y en el urotelio. El CGRP produce relajación de la musculatura lisa del cuello vesical vía activación de los receptores neuronales y musculares del CGRP a través de mecanismos independientes del NO y de la COX (Martínez-Sáenz et al., 2011).

1.5.3.3.4. Angiotensinas

Un sistema renina-angiotensina autocrino/paracrino fue identificado en la vejiga humana, en donde la angiotensina II (ANG II) produce contracción del detrusor de varias especies incluido el hombre a través del receptor de la angiotensina AT₁ (Weaver-Osterholtz et al., 1996). Dicha contracción es dependiente de la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de los canales VOC tipo L. La obstrucción del flujo de salida favorece la liberación de ANG II, la cual, afecta al tono de la vejiga actuando como factor trófico en la pared vesical, al producir hipertrofia e hiperplasia de la misma, así como, un incremento en la producción de colágeno de la pared vesical (Andersson & Arner, 2004).

1.5.3.4. *Prostanoides*

Los prostanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) son sintetizados por las enzimas de la vía de la ciclooxygenasa (COX) y desempeñan un papel esencial en la fisiología y fisiopatología del Tracto Urinario (Andersson & Arner, 2004). Dos isoformas de la COX han sido identificadas, una constitutiva o COX-1 y una inducible o COX-2. La COX-1 es producida en condiciones fisiológicas mientras que la COX-2 es activada a través de varios estímulos fisiopatológicos como daños en la mucosa, sobreestiramiento muscular, hiperestimulación nerviosa e inflamación. La síntesis de los prostanoides es producida localmente, en el músculo detrusor y en la mucosa, en respuesta a estímulos fisiológicos como el estiramiento de la pared de la vejiga urinaria. Asimismo, lesiones de la mucosa vesical y mediadores de la inflamación favorecen la síntesis y liberación de prostaglandinas (Andersson & Arner, 2004). La COX-1 y la COX-2 están expresadas en las *Células Intersticiales de Cajal* en la vejiga urinaria, sugiriendo así, que prostanoides liberados desde dichas células y desde

el urotelio están involucrados en la contracción de la pared vesical (de Jongh et al., 2007). Los prostanoideos desempeñan, asimismo, un papel relevante en la contractilidad ureteral, ya que la PGE_2 aumenta la contractilidad ureteral en cerdos con ureteres obstruidas y promueve la relajación del uréter no obstruido (Lowry et al., 2005). Además, la $PGF_{2\alpha}$ contrae y las PGE_1 y PGE_2 relajan el uréter de varias especies incluido el hombre (Andersson & Forman, 1978). La expresión y actividad de la COX-2 está incrementada en uréteres con obstrucción aguda (Nakada et al., 2002; Norregaard et al., 2006). Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, como el diclofenaco (inhibidor no selectivo de la COX) y el NS 398 (inhibidor selectivo de la COX-2) reducen las contracciones ureterales por lo que son frecuentemente administrados en cuadros obstructivos agudos del uréter relacionado con el cólico renal (Mastrangelo et al., 2000).

Prostaglandinas como la $PGF_{2\alpha}$, la PGE_1 y la PGE_2 producen la contracción del detrusor humano por acción directa sobre el músculo liso y/o indirectamente por la modulación de la neurotransmisión, contribuyendo así, al mantenimiento del tono de la pared vesical (Andersson & Arner, 2004). En la vejiga de cobaya, los prostanoideos son liberados por la estimulación nerviosa y son capaces de facilitar el acoplamiento excitación/contracción por la movilización del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Creed & Callahan, 1989). Los prostanoideos producen una contracción lenta del detrusor, por lo que no parece probable una implicación directa de las prostaglandinas en el vaciado de la vejiga, sino que podrían desempeñar un papel modulador de la neurotransmisión aferente y eferente vesical (Andersson & Arner, 2004). De hecho, los inhibidores de la COX disminuyen la frecuencia miccional en modelos animales de cistitis, pero su papel en dicha disfuncionalidad está aún por determinar. Los inhibidores de la COX son eficaces en el tratamiento de la vejiga hiperactiva al mejorar el cuadro irritativo característico y los parámetros urodinámicos (Andersson et al., 2010).

1.5.3.5. *Endotelinas*

La presencia de endotelinas en el detrusor de varias especies está ampliamente documentada (Andersson & Arner, 2004; Andersson, 2010). Se han descrito tres isoformas de endotelinas: ET-1, ET-2 y ET-3, las cuales, actúan a través de dos subtipos de receptores: ET_A y ET_B (Sakurai et al., 1990). La isoforma ET-1, y en menor medida, la ET-3 producen contracciones lentas en el detrusor humano vía activación de los receptores ET_A, los cuales, están acoplados al influjo de Ca²⁺ extracelular a través de la activación de los canales VOC tipo L y la liberación de Ca²⁺ desde el RS (Andersson & Arner, 2004). Los receptores ET_A están presentes en la vaina muscular longitudinal externa, en los vasos sanguíneos y en la submucosa del detrusor y son responsables de la contracción muscular (Traish et al., 1992). Asimismo, la ET-1 desempeña una acción moduladora de la neurotransmisión excitadora de la vejiga urinaria (Donoso et al., 1994). No obstante, falta por establecer si los antagonistas de los receptores ET_A reducen la actividad espontánea del detrusor, así como su posible utilidad terapéutica en los cuadros de hiperactividad vesical (Andersson, 2010). En la obstrucción del flujo de salida existe un marcado incremento de la expresión de los receptores ET_A, indicando así, un posible papel de dichos receptores en la hiperplasia e hipertrofia del detrusor asociada al cuadro obstructivo (Khan et al., 1999).

Los receptores de ET-1 pre- y post-sinápticos desempeñan, asimismo, un papel fundamental en la regulación de la tensión de la musculatura lisa de la región de salida de la orina. Así, la ET-1 produce contracción del cuello de la vejiga urinaria del cerdo vía activación de los receptores ET_A musculares acoplados a la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales de Ca²⁺ dependientes (tipo L) e independientes de voltaje. Asimismo, receptores ET_A neuronales modulan la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente de NO en el cuello vesical (Arteaga et al., 2012b) y los receptores ET_B, presentes en el músculo liso, median la relajación del cuello a través de mecanismos independientes del NO y de la COX, vía activación de la PKA e involucrando la apertura de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca}. Los receptores ET_B están, asimismo, involucrados en la modulación de la neurotransmisión NANC inhibitoria del cuello vesical (Arteaga et al., 2012a).

1.6. FISIOPATOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO

1.6.1. Obstrucción ureteral aguda

El cólico renal es causado por una obstrucción ureteral aguda, parcial o completa, que en la gran mayoría de los casos (hasta un 90%) suele ser debida a la presencia de un cálculo que provoca una distensión aguda del sistema colector. En un 5-10% de los casos, es debido a alteraciones de las vías urinarias no litiásicas, como son la presencia de coágulos por tumoraciones renales, la atonía ureteral por pielonefritis, la necrosis papilar o los procesos neoplásicos uroteliales. El resto de pacientes con cólico renal pueden presentar una obstrucción ureteral extrínseca secundaria a otros procesos, como enfermedades intestinales (apendicitis, diverticulitis, enfermedad de Crohn), ginecológicas, retroperineales, vasculares, oncológicas y hematológicas o complicaciones postquirúrgicas (Esquena et al., 2006).

1.6.1.1. Epidemiología

El cólico renal está considerado una urgencia urológica que comporta una de las formas más lacerantes de dolor en el ser humano, por lo que requiere un rápido diagnóstico y tratamiento. Se estima que más del 12 % de la población sufrirá un cólico renal durante su vida con una tasa de recurrencia alrededor de un 50 % (Shokeir, 2001). La frecuencia de presentación es mayor por la mañana y durante las estaciones calurosas y está relacionada con la menor producción urinaria nocturna y con situaciones en las que se producen pérdidas elevadas de líquidos, como sucede en la sudoración intensa (Boari & Manfredini, 2003). Estos factores aumentarían significativamente la concentración de orina, actuando como un factor predisponente para desarrollar una obstrucción ureteral, que afectaría más a varones de edad avanzada (Chauhan et al., 2004). Estudios epidemiológicos llevados a cabo en los Estados Unidos muestran que los hombres caucasianos tienen mayor incidencia de presentación, seguidos por las mujeres caucasianas, mujeres y hombres de raza negra (Sarmina et al., 1987; Soucie et al., 1994). En estudios que abarcan la población hispánica norteamericana, no se observan diferencias en cuanto a la raza o género, pero no obstante, se detecta un mayor número de intervenciones urológicas por litiasis sintomáticas en mujeres hispanicas (Dall'era et al., 2005). El 25 % de los pacientes que

presentan cólicos renales recurrentes tienen un historial de familiares con urolitiasis (Ljunghall et al., 1985).

1.6.1.2. Fisiopatología

La obstrucción ureteral aguda provoca un aumento brusco de la presión intraluminal, que se extiende a las terminaciones nerviosas nociceptiva (quimiorreceptores y mecanorreceptores) localizadas en la submucosa y en la lámina propia de la cápsula renal peripiélica (responsables del dolor renal), la pelvis renal (responsables del dolor reno-ureteral), y en menor densidad, en el uréter proximal (Moody et al., 1975). Asimismo, el músculo liso de la pared ureteral se contrae en el intento de expulsar el agente responsable de la obstrucción. Una contracción prolongada isotónica conlleva una mayor formación de ácido láctico, que a su vez, activará las fibras lentas tipo A (mielinizadas) y las rápidas tipo C (no mielinizadas). Estos impulsos generados llegan a los segmentos medulares D11-L2, alcanzando al SNC, donde son clasificados por localización, carácter e intensidad, hecho que potenciará el cuadro obstructivo, y en el que la inflamación local no parece desempeñar un papel prioritario (Cervero & Sann, 1989; Klahr, 1991).

La distribución del dolor renal es el resultado de una convergencia somato-visceral de la información neural recibida desde la médula espinal, de manera que el dolor se puede sentir en cada órgano que comparte inervación con el Tracto Urinario. Esto explicaría la típica irradiación del dolor desde las fibras espinales a las fibras aferentes renales y ureterales, y las fibras sensitivas desde la piel, correspondientes a aquellas zonas inervadas por los nervios génitofemoral, ilioinguinal e iliohiposgástrico. El resto de la sintomatología visceral que con frecuencia se asocian al cólico renal, como las náuseas, los vómitos, la taquicardia y la disminución del peristaltismo intestinal, son debidos a las múltiples conexiones existentes entre los plexo renal, celíaco y mesentérico que llegan a la médula espinal al mismo nivel, produciendo la irritación local (Travaglini et al., 2004).

Se han descrito 3 fases sucesivas en la obstrucción ureteral aguda. La primera fase puede durar entre 0-1.5 horas, en donde aumentan el flujo sanguíneo renal y la presión ureteral; la segunda fase, con una duración entre 1.5-2 horas, disminuye el flujo sanguíneo renal y la presión ureteral sigue aumentando, y finalmente la tercera y última fase, con una duración superior a 5 horas, el flujo sanguíneo renal y la presión

ureteral disminuyen conjuntamente (Travaglini et al., 2004). El aumento inicial del flujo sanguíneo renal es debido a una vasodilatación preglomerular, que muchos estudios demuestran que es secundaria a un aumento de la producción local de prostaglandinas (PGE_2 y PGI_2), y donde el aumento del NO también tendría un papel relevante (Schulman, 1974; Shokeir, 2002). Por otro lado, la PGE_2 inhibe la secreción de hormona antidiurética durante la obstrucción aguda, hecho que incrementa más la presión ureteral como consecuencia del aumento del flujo urinario. Posteriormente, el flujo sanguíneo renal y la presión ureteral disminuyen por un mecanismo de autodefensa con la subsiguiente vasoconstricción preglomerular que aumentará las resistencias intrarenales, siendo dicha reacción establecida por diferentes mediadores como la ANG II, el TXA_2 , la ADH y la ET-1 (Shokeir, 2002). La disminución de la presión ureteral es secundaria a una disminución muy importante del filtrado glomerular pero siempre manteniéndose en unos valores mínimos en un fenómeno que se explicaría porque la orina acumulada en la pelvis renal podría escapar por reflujos pielovenosos y/o pielolinfáticos. Todo este proceso explicaría, en parte, la observación clínica de una mejoría espontánea de la intensidad del dolor algunas horas después de su inicio, en la mayoría de los pacientes (Lanzzone et al., 1995). El dolor del cólico renal no es causado directamente por las contracciones espasmódicas del uréter obstruido, y por tanto, el uso de fármacos espasmolíticos tendrán escasa utilidad y además, podrían ser contraproducentes al inhibir el peristaltismo fisiológico ureteral dificultando y retardando la eliminación del cálculo enclavado, pudiendo, en algunos casos, provocar la anulación del filtrado glomerular y/o una lesión de la vía urinaria, a nivel del fórnix calicial, con extravasación importante de orina perirrenal. Ésta puede ser reabsorbida por los sistemas venosos y linfáticos del espacio intersticial, siendo otro mecanismo de defensa para disminuir la tensión intraluminal, y las presiones piélica y ureteral, y que incluso se inicia antes de la rotura de la vía. Afortunadamente, el riesgo de fracaso renal definitivo no se establece hasta varias semanas después de haberse establecido una obstrucción completa con anulación del filtrado glomerular (Vaughan et al., 1971; Vela Navarrete & García-Fisac, 1983).

1.6.1.3. *Tratamiento farmacológico*

El manejo conservador se considera la primera línea de tratamiento del cólico renal simple ya que dos tercios de las litiasis ureterales son expulsadas espontáneamente en las 4 semanas siguientes al inicio de la sintomatología. Una litiasis ureteral que no ha sido expulsada después de 1-2 meses es altamente improbable que se expulse espontáneamente. Los objetivos del tratamiento son establecer un buen control del dolor, y conservar al máximo la función renal suprimiendo o aliviando los efectos de la obstrucción ureteral (Hubner et al., 1993; Miller & Kane, 1999).

Existen múltiples estrategias a diferentes niveles fisiopatológicos para el tratamiento del cólico renal por obstrucción ureteral. Una de ellas es el tratamiento farmacológico, que asienta principalmente en dos grupos: anticolinérgicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Esquena et al., 2006). Los fármacos anticolinérgicos como la N-butilbromuro de hioscina se han utilizado clásicamente como analgésicos en el cólico renal al inducir la relajación de la musculatura lisa con disminución del espasmo ureteral, que ha sido la explicación fisiopatológica clásica del dolor. Actualmente está claramente establecido que el mecanismo fisiopatológico del dolor es la distensión de la cápsula renal por la obstrucción, siendo el espasmo ureteral resultante, una respuesta que contribuye de forma menor al cuadro sintomatológico. A pesar de todo, todavía está muy extendido el uso de estos fármacos como tratamiento coadyuvante de los AINEs y los opiáceos en la crisis aguda. Aunque existen estudios que demuestran que el uso de fármacos antimuscarínicos disminuye el dolor, no se ha demostrado que sean tan eficaces como los opiáceos, los AINEs u otros analgésicos cuando son usados de forma aislada (Benyajati, 1986; Stankov et al., 1994; Jones & Dula, 1998). Además, la administración de antimuscarínicos junto con AINEs o con opiáceos no aporta beneficio analgésico, ni disminuye la sintomatología vegetativa característica. Se cree que la inclusión de fármacos antimuscarínicos al tratamiento, al disminuir el peristaltismo ureteral, retardaría el progreso ureteral de la causa obstructiva, dificultando y aumentando el tiempo de expulsión (Jones, 2001; Holdgate & Oh, 2005). Diversos estudios muestran que las propiedades analgésicas y antiinflamatorias de los AINEs, los cuales inhiben la síntesis de PGs y disminuyen el flujo sanguíneo renal, reduciendo la producción urinaria y la presión intraluminal (Labrecque et al., 1994; Smally, 1997; Holdgate & Pollock, 2005). Existe una amplia variedad de fármacos, dosis y vías de administración, así el naproxeno y el diclofenaco

inducen una potente analgesia con baja incidencia de efectos adversos, el ibuprofeno es el que tiene el menor riesgo de efectos indeseables, y la indometacina tiene un efecto muy potente pero con alta incidencia de efectos adversos (Brough et al., 1998; Davenport et al., 2005; Carter & Green, 2011).

1.6.2. Reflujo Vésicoureteral (RVU)

Según El *Comité Internacional para el Estudio del Reflujo*, el reflujo vésicoureteral (RVU) es una de las patologías urinarias más frecuentes, en población infantil hasta los 3 años, consistente en el paso retrógrado o contracorriente de la orina de la vejiga al uréter. Tiene una prevalencia entorno al 2 % de los niños y suele acompañarse, en un 50 % de los casos, de infección de las vías urinarias (Sargent, 2000). Su forma de presentación es muy variada, pudiendo abarcar desde una hidronefrosis diagnosticada por ecografía prenatal, un episodio de infección urinaria, el estudio de hermanos de pacientes con RVU o el estudio de otras malformaciones renales o extrarrenales, como el ano imperforado y otras alteraciones producidas durante el desarrollo embrionario. En el 5 % al 10 % de los casos, el RVU será detectado con ocasión del estudio de otra patología urinaria, como hematuria, litiasis, enuresis, insuficiencia renal, etc. El RVU tiene un componente genético marcado, encontrándose en un 30 % a 35 % en el estudio de hermanos con RVU y aumentando a un 50% en los hermanos menores de un año. En este grupo sólo un 5 % presenta daño renal en el momento del diagnóstico. Asimismo, RVU presenta cerca del 60 % de los hijos de padres con antecedentes clínicos, especialmente en el caso de las madres con RVU, siendo un proceso más frecuente en población blanca. Estos datos, en conjunto, sugieren una posible transmisión hereditaria ligada al cromosoma X, en forma autosómica de expresión variable, de dicha disfuncionalidad urinaria (Sargent, 2000).

Las condiciones anatómicas que previenen normalmente la aparición de un reflujo son una unión uréterovesical con su dispositivo antirreflujo intacto. Así, el uréter entra a la vejiga en un trayecto oblicuo intramural y luego submucoso para desembocar en el ángulo del triángulo. A nivel del hiato ureteral, las fibras del detrusor se fijan a la adventicia del uréter sujetando, así, el uréter a la entrada de la vejiga de manera laxa. El detrusor ofrece al uréter intravesical un sostén posterior sólido y fijo. La longitud del trayecto submucoso del uréter crece con la edad, triplicándose entre el nacimiento y los 12 años. La relación normal entre la longitud del uréter intravesical y

su diámetro debe ser 4-5/1. Durante el llenado, la presión intravesical no aumenta prácticamente nada y el vaciamiento ureteral se efectúa por una presión ureteral superior a la de la vejiga. En cambio durante el vaciado, la contracción activa del trigono desciende el meato y lo coloca contra la pared muscular, el hiato ureteral se cierra por contracción del detrusor y el trigono y la presión intravesical comprime el uréter submucoso, por lo que cualquier cambio en la posición y forma del uréter en su trayecto intravesical altera dicho mecanismo antirreflujo. Hay que diferenciar los reflujos pasivos presentes sólo durante el llenado vesical y los reflujos activos visualizados durante la micción, constituyendo, estos últimos, los verdaderos reflujos patológicos (Tekgul et al., 2012). Se han descrito dos tipos de RVU:

. *Reflujo primario o idiopático*. Se origina como consecuencia de una anomalía congénita de la unión vésicoureteral producida por la laxitud del trigono, una deficiencia de las fibras musculares del uréter intravesical y/o un trayecto submucoso muy corto secundario a un meato urinario ectópico. Este reflujo suele desaparecer de forma espontánea con el crecimiento, especialmente en los primeros años de vida, por maduración de la unión uréterovesical y crecimiento en la longitud del uréter intravesical (Sjostrom et al., 2004).

. *Reflujo secundario*. Es el reflujo asociado a una alteración en la disposición anatómica producida como consecuencia de la destrucción de los mecanismos valvulares por maniobras iatrogénicas, la esclerosis del detrusor, la cistitis intersticial, la vejiga neurogénica con parálisis parcial o total del detrusor y el trigono, el vaciamiento incompleto de la vejiga y las anomalías congénitas de la implantación uréterovesical, como sucede en el uréteroceles, el uréter ectópico de implantación extravesical y la obstrucción cérvicouretral (Riyach et al., 2014).

El progreso del RVU da lugar al desarrollo de infecciones urinarias como consecuencia del vaciamiento irregular e incompleto de la vejiga. Asimismo, es característica la dilatación de las vías excretoras, mecanismo esencialmente mecánico, producido como consecuencia del incremento del trabajo del uréter distal para propulsar varias veces la misma orina y por una presión retrógrada incrementada que provoca, en última instancia, la dilatación del uréter, la pelvis y los cálices renales. Si este proceso se mantiene origina una gran dilatación de todo el Tracto Urinario Superior dando lugar al denominado *Megauréter refluente*. El RVU puede originar nefropatía de reflujo, la cual, es una lesión parenquimatosa renal que se presenta especialmente en los casos severos de reflujo e infección urinaria (Peters et al., 2010).

1.6.2.1. Cuadros clínicos de RVU

Se ha descrito la existencia de 5 cuadros de reflujo en relación a su grado de severidad, siendo denominados como RVU de:

- . Grado I, en el que el reflujo compromete únicamente al uréter.
- . Grado II, en el que se afecta tanto al uréter como al Sistema Colector sin producirse dilatación del mismo.
- . Grado III, en el que se produce una dilatación leve a moderada del uréter y la pelvis renal.
- . Grado IV, en el que es característica la dilatación de la pelvis y los cálices renales con eversión de los mismos y atrofia parenquimatosa.
- . Grado V, en el cual se origina un reflujo masivo con gran tortuosidad ureteral y la presencia de reflujo intrarrenal.

La resolución espontánea del reflujo está relacionada con la severidad del cuadro clínico. Así, los RVU grados IV o V tienen una resolución de cerca del 15 % a 25 % a los 4 años, el grado III un 40 % de resolución y los grados I a II una resolución del 80 % a los 5 años. La resolución para los grados leve a moderado es de un 30 % a 35 % por año, siendo mayor en menores de un año, especialmente en varones. La resolución espontánea disminuye considerablemente después de los 6 años y, en general, es más frecuente en mujeres (Sargent, 2000).

1.6.2.2. Diagnóstico del RVU

El diagnóstico del RVU se realiza mediante una uretrocistografía miccional seriada, procedimiento ambulatorio sin anestesia, realizado con un catéter fino colocado en vejiga vía uretra, que permite visualizar la vejiga durante el llenado y vaciado para descartar la presencia de reflujo y de posibles malformaciones vesicouretrales asociadas, propias de los RVU secundarios (Leroy et al., 2007). Asimismo, dicho diagnóstico se lleva a cabo mediante ultrasonido con instilación vesical de una albúmina ionizada y cistoscopia, la cual, permite observar la longitud del trayecto submucoso del uréter, que normalmente mide 5 mm en los recién nacidos y 14 mm en los adultos (Darge & Riedmiller, 2004).

1.6.2.3. *Tratamiento del RVU*

El tratamiento del RVU secundario corresponde a la etiología de base. La base del tratamiento del RVU primario es el tratamiento farmacológico, consistente en la profilaxis antibiótica (nitrofurantoína o cefadroxilo), con el objeto de mantener la orina estéril, en espera de la resolución espontánea del reflujo (Conway et al., 2007). Esto debe acompañarse de un buen manejo de factores que condicionan la persistencia del RVU y la presencia de infecciones urinarias recurrentes como son el estreñimiento, la disfunción vesical y la micción infrecuente, lo que actualmente se conoce como *Síndrome de mala eliminación*. El tratamiento médico debe incluir exámenes bacteriológicos de orina periódicos o frente a la sospecha clínica de una infección urinaria. El tratamiento quirúrgico está indicado en pacientes mayores de 6 años con reflujos de alto grado (IV y V) o en los que son resistentes al tratamiento farmacológico (infección urinaria recurrente y/o mala tolerancia a la medicación) (Baek & Kim, 2013; Dinckan et al., 2013). Aproximadamente el 20 % de los reflujos de grado severo se resuelven antes de los dos años y el 25 % de los niños van a presentar infecciones urinarias recurrentes, a pesar de la profilaxis, durante los dos primeros años. Se plantea en los niños menores de un año de edad el beneficio de una circuncisión, período de la vida donde habría una directa relación entre fimosis e infección urinaria. Los estudios urodinámicos deben reservarse para aquellos pacientes con sospecha clínica o radiológica de disfunción vesical y en aquellos en los que fracasa la cirugía (Sargent, 2000).

1.6.3. Incontinencia Urinaria (IU)

La IU según la *Sociedad Internacional de Continencia (ICS)* es definida como: “*la pérdida involuntaria de orina objetivamente demostrable que origina un problema social o higiénico*”. Ya que la IU es un problema percibido por los pacientes de distinta manera, en 2002 la ICS, la definió como: “*la manifestación por parte del paciente de escape de orina*” (Abrams et al., 2002), la cual, se puede presentar tanto en personas sanas como asociada a diferentes enfermedades. A pesar que la IU no implica un pronóstico de gravedad, limita la autonomía, reduce la autoestima y deteriora sensiblemente la calidad de vida de quién la padece (Espuña Pons, 2003).

La IU en los últimos años ha experimentado una creciente atención por parte de todos los medios sociales (responsables políticos, personal sanitario, población en general e incluso medios de comunicación), en parte debido al envejecimiento de la población. Pese a que las empresas farmacéuticas han desarrollado fármacos útiles en algunos tipos de IU, el mayor gasto relacionado con su control sigue estando relacionado con los absorbentes derivados de la celulosa (Dingwall, 2008; Bicalho & Lopes, 2012).

La incidencia de IU aumenta linealmente con la edad hasta ser considerada como un síndrome geriátrico, tanto por su elevada prevalencia en mayores de 65 años como por el impacto negativo que ocasiona en el anciano que la sufre (Verdejo Bravo et al., 1999). En un estudio epidemiológico realizado en Noruega en 27.938 mujeres mayores de 20 años, el 25 % decía presentar algún tipo de IU (Hannestad et al., 2000). En Estados Unidos, en dos estudios realizados en varones, se ha encontrado una prevalencia de IU del 12 % (Anger et al., 2006; Diokno et al., 2007). En estudios realizados en mujeres se encuentran cifras muy diferentes que oscilan entre un 15 % (Espino et al., 2003), cuando se estudian mujeres de origen latino de más de 65 años o el 18 % en mujeres de origen asiático (Huang et al., 2006; Dooley et al., 2008; Minassian et al., 2008). En España existe una prevalencia de IU entorno al 35 % de las pacientes con más de 64 años (Dios-Diz, 2003), en un 23 % en mujeres mayores de 18 años (Hunnskaar et al., 2004) y en un 14 % en mujeres entre 40 y 64 años (Nieto, 2003; E, 2005). El porcentaje de IU grave o significativa oscila entre el 3% y el 17%. A pesar de esta elevada prevalencia global, sorprende el escaso número de consultas médicas que se generan por este motivo (Petros & Woodman, 2008). La mayoría de los pacientes utiliza absorbentes como método de control con un elevado coste no sólo en términos económicos sino ecológicos (empleo masivo de celulosa) (Subak et al., 2012).

Las IU se clasifican, de acuerdo al cuadro sintomatológico y a las directrices de la ICS en: incontinencia de urgencia, incontinencia paradójica o por rebosamiento; incontinencia de estrés o de esfuerzo e incontinencia por cuadros mixtos de urgencia y estrés.

1.6.3.1. *Incontinencia Urinaria de Urgencia (IUU)*

La IUU es la pérdida involuntaria de orina acompañada o inmediatamente precedida de urgencia miccional. Por *urgencia miccional* entendemos la percepción por el paciente de un deseo miccional súbito, claro e intenso, difícil de demorar y con miedo al escape. La urgencia suele ser consecuencia de una contracción involuntaria del detrusor vesical durante la fase de llenado vesical, es decir por la hiperactivación colinérgica del detrusor, llevando así a escapes repentinos de orina, aumento de la frecuencia miccional, y en ocasiones nocturia (Abrams et al., 2002). La IUU es la forma más habitual de IU en personas mayores de 75 años, sobre todo en varones (40%-80%) (Hunskar et al., 2004). En la mujer, la prevalencia de IUU oscila entre el 11% y el 20%, siendo más frecuente en la mujer postmenopáusica (Luber et al., 2001).

La etiología de este incremento de la actividad colinérgica es multifactorial incluyendo alteraciones de la estructura y de la innervación sensorial y motora del detrusor (Turner & Brading, 1997). De hecho, una función deficitaria del detrusor junto con la liberación incrementada de una amplia variedad de mediadores químicos (ATP, NO, bradicinina, endotelinas, etc.) desde el urotelio, generan una exacerbación de la actividad aferente que da lugar, en última instancia, a la inestabilidad de la pared vesical con contracciones involuntarias y urgencia miccional, características de la vejiga hiperactiva (Yoshimura & Chancellor, 2003; Yoshimura et al., 2008).

El tratamiento de estos cuadros de IU con fármacos antimuscarínicos M₂/M₃ como la oxibutinina, la darifenacina, la fesoterodina, la tolterodina, la propiverina, el cloruro de trospium y la solifenacina son efectivos (con una eficacia superior al 80 % de los casos) aunque no exentos de efectos secundarios, como la sequedad de boca y la diarrea. El uso de antidiuréticos, como la desmopresina, debe considerarse para tratar la nocturia, aunque con cierta cautela ya que puede provocar desequilibrio hidroelectrolítico, como hiponatremia (Andersson & Arner, 2004; Yoshimura et al., 2008).

En la actualidad, se están estudiando diferentes estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hiperactividad vesical. Entre ellas cabe destacar, el uso de los agonistas adrenérgicos β_3 , como el mirabegrón, para inhibir la contracción del detrusor (Leone Roberti Maggiore et al., 2014). Asimismo, los canales de K⁺ podrían ser excelentes dianas terapéuticas para dicha patología. De hecho, la baja regulación de los canales BK_{Ca}, SK_{Ca} y K_{ATP} contribuye a la hiperactividad de la pared de la vejiga, al

incrementar el nivel basal de la fosforilación de la MLC, por lo que activadores de dichos canales pueden ser de utilidad en el tratamiento de la vejiga hiperactiva. No obstante, dichos fármacos tienen efectos secundarios, como son un marcado efecto hipotensor por lo que su administración debe limitarse (Gopalakrishnan & Shieh, 2004; Darblade et al., 2006). Los inhibidores de las fosfodiesterasas PDE1 y PDE4 son otra posible opción terapéutica en la hiperactividad vesical (Andersson et al., 2007). La expresión de los receptores purinérgicos está alterada en la vejiga hiperactiva por lo que pueden representar una alternativa terapéutica valiosa tanto para controlar la excitabilidad del detrusor como la actividad neuronal aferente (Moore et al., 2001). De hecho, una liberación incrementada del ATP y de prostaglandinas desde el urotelio puede alterar también la actividad del detrusor (Birder & de Groat, 2007). La proteína Rho cinasa influye en la contracción del detrusor, constituyendo así, otra posible diana terapéutica en la hiperactividad vesical (Wibberley et al., 2003). Por otra parte, las células intersticiales de Cajal, ejercen un papel importante en las contracciones espontáneas del detrusor (Andersson & Arner, 2004; Yoshimura et al., 2008). Los inhibidores de la tirosina cinasa disminuyen la amplitud de las contracciones espontáneas en la vejiga de cobaya y del hombre, sugiriendo así, la implicación de estas células en la urgencia miccional (Biers et al., 2006).

El conocimiento de la compleja fisiología celular y de los mecanismos de control de la función vesical son claves para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Sin embargo, la naturaleza multifactorial de la urgencia miccional complica, en gran medida, el tratamiento de la vejiga hiperactiva (Drake, 2007; Gulur & Drake, 2010).

1.6.3.2. Incontinencia paradójica o por rebosamiento

La IU paradójica o por rebosamiento, también llamada *incontinencia urinaria inconsciente* o *retención crónica de orina*, es la IU que se aprecia en pacientes sin deseo miccional. El paciente, generalmente de avanzada edad, presenta una IU que suele requerir el uso de absorbentes. Además, suele mostrar deterioro cognitivo, poliuria, polidipsia, disminución del calibre del chorro miccional, lesiones cutáneas por rascado y empeoramiento del estado general, con la aparición de edemas. La causa suele ser una obstrucción infravesical con dilatación de las vías urinarias superiores (pelvis y cálices renales). El cuadro que acompaña a la IU es la denominada *nefropatía obstructiva*,

en la que la presión dentro del sistema calicial se iguala a la presión tubular o incluso a la presión del filtrado glomerular, lo que ocasiona una disfunción renal en su capacidad de concentración y acidificación urinaria. Esta circunstancia suele darse en casos de obstrucción del flujo de salida por la HBP o por el cáncer de próstata. Su tratamiento contempla la presión de la musculatura inguinal (*maniobra de Credé*) y el autosondaje para favorecer el vaciamiento total de la vejiga (Yang et al., 2009).

1.6.3.3. Incontinencia de Estrés o de Esfuerzo (IUE)

La IU de estrés (IUE) se define como la pérdida involuntaria de orina que se asocia al esfuerzo físico. El ejercicio provoca un aumento de la presión abdominal (como sucede durante la tos y el estornudo) y, como consecuencia, se produce un incremento de la presión intravesical, que cuando supera la presión del esfínter uretral da lugar a escapes continuados de orina. Se han descrito tres cuadros de IUE: Tipo I, II y III. El Tipo I y II son producidas por las alteraciones anatómicas en la base de la vejiga, concretamente por la pérdida del ángulo uretrovesical posterior, siendo característica, además, en el Tipo II la caída de la vejiga y de la uretra. En el Tipo III existe una disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto de forma permanente. Esta patología es muy frecuente en mujeres de edad avanzada (Dugan et al., 2001; Coyne et al., 2013) y está relacionada fundamentalmente con la obesidad, los partos múltiples y la disfuncionalidad en el control motor de la pared vesical (Hannestad et al., 2000). Por el contrario, la IUE en el varón es rara y, por lo general, yatrogénica, asociada a cirugía prostática previa (tras adenomectomías o resecciones transuretrales prostáticas y, sobre todo, tras prostatectomía radical por adenocarcinoma prostático) (Erauso et al., 2012). Dicha IU constituye la forma más grave de IU y la de mayor frecuencia de presentación en postoperatorios de intervenciones quirúrgicas retropúbicas (cirugías ginecológicas). Aunque su etiología es multifactorial, cabe destacar el parto como principal factor predisponente en el que es característica la existencia de una contracción uretral insuficiente para producir el cierre uretral como consecuencia de la alteración en la regulación nerviosa motora y somática de la base de la vejiga y la uretra (Cannon et al., 2003).

En las IUE tipo III, las terapias farmacológicas utilizadas son de escasa eficacia utilizándose fundamentalmente los agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 y el

inhibidor de la recaptación de 5-HT (duloxetina) para favorecer la contracción de la base de la vejiga urinaria (Cannon et al., 2003). Recientemente, se ha visto que la terapia combinada de ejercicios de fortalecimiento del suelo pélvico junto con la administración de la duloxetina es más resolutive que la terapia farmacológica aislada (Abrams et al., 2002; Robinson & Cardozo, 2010).

1.6.3.4. Incontinencia por cuadros mixtos de urgencia y estrés

Se trata de un tipo de IU asociada a urgencia miccional y también al esfuerzo, al ejercicio, a la tos y a los estornudos. Se estima que aproximadamente un 30 % de las mujeres presenta escapes urinarios asociados al esfuerzo con urgencia miccional. Los factores predisponentes de este proceso son la edad, la raza caucásica, el índice de masa corporal, la alteración del metabolismo tiroideo y la cirugía retropúbica como la histerectomía (Minassian et al., 2008).

Una primera elección es el tratamiento conservador que incluye cambios en el comportamiento (cambio de dieta e ingesta moderada de líquidos), la pérdida de peso y los ejercicios para fortalecer la musculatura pélvica. La segunda opción es un tratamiento farmacológico, donde principalmente se trata al paciente con antagonistas muscarínicos M₂/M₃ (como la oxibutinina) e inhibidores de la recaptación neuronal de la 5-HT (duloxetina). Se han estudiado otros fármacos, tales como antidepresivos tricíclicos pero su papel aún no está bien definido (Hashim & Abrams, 2006). Mientras que los fármacos antimuscarínicos son preferentemente usados en IU mixtas donde lo que predomina es la urgencia, la duloxetina, se aplica cuando predominan los síntomas de estrés (Robinson & Cardozo, 2010). Como último recurso se recurre a la cirugía pero existe escasa literatura referida a la eficacia de la misma para estos cuadros mixtos (Holmgren et al., 2005).

1.6.4. Síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI)

En la década de los 90, los STUI se describían como *prostatismo* o *síndrome prostático*. En 1994, Abrams utiliza el término *LUTS*, que proviene del término anglosajón "*Lower Urinary Tract Symptoms*", para describir y clasificar una serie de síntomas frecuentes en el varón que se manifestaban y se relacionaban con distintas patologías del Tracto Urinario Inferior. En 2011, expertos de la 5ª *International*

Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia recomendó la utilización del término STUI (Abrams et al., 2010).

Los STUI se dividen en tres grupos: síntomas de llenado (urgencia miccional, nocturia, polaquiuria diurna, dolor suprapúbico), síntomas de vaciado (dificultad de inicio miccional, disminución del calibre y fuerza del chorro miccional, micción intermitente y prolongada, retención de orina) y síntomas postmiccionales (sensación de vaciado incompleto y goteo posmiccional) (Jefferies et al., 2013; Yoshimura et al., 2014). Los STUI están asociados fundamentalmente, con el desarrollo de la HBP, característica en hombres de avanzada edad, lo cual, condiciona en gran medida su calidad de vida. Un estudio en varones con edades comprendidas entre 60-70 años, indicaba que un 47% de ellos sufrían de STUI, el cual, estaba relacionado con el envejecimiento, la enfermedad cardiovascular, la diabetes mellitus y la depresión (Safarinejad, 2003).

El tratamiento farmacológico con antagonistas adrenérgicos α_1 e inhibidores de la 5 α -reductasa, enzima que favorece el paso de testosterona a su metabolito activo 4,5 α -dihidrotestosterona, es resolutivo por producir la relajación de la musculatura lisa del cuello de la vejiga y la uretra y reducir el volumen de la próstata, respectivamente (Chapple, 2010), siendo además, la terapia farmacológica de elección en la HBP asociada con la hiperactividad vesical (Chung & Kaplan, 2010). El uso de los inhibidores de la PDE5, frecuentemente utilizados para el tratamiento de la disfunción eréctil, son también de gran eficacia en el tratamiento del STUI por producir la relajación del músculo liso de la región de salida de orina (Andersson et al., 2007).

1.7. BRADICININA y CALIDINA

En 1920, Frey y colaboradores identificaron una sustancia que causaba hipotensión y que se producía fundamentalmente en el páncreas, razón por la cual, fue denominada *calícreína*, sobre la base del término griego de dicho órgano, *kallicréas*. En 1937, Werle y colaboradores demostraron que las calicreínas generan una sustancia farmacológicamente activa, a partir de algún precursor inactivo presente en el plasma. Más tarde, en 1948, Werle y Berek llamaron a esta sustancia activa calidina, y demostraron que era un polipéptido separado de una globulina plasmática que denominaron calidinógeno (Werle & Zach, 1970; Bhoola et al., 1992).

El interés en este campo, se intensificó cuando Rocha y Silva y colaboradores (1949) señalaron que la tripsina y algunos venenos de serpiente intervenían en la globulina plasmática para producir una sustancia que reducía la presión arterial y que ocasionaba la contracción lenta de la pared intestinal, razón por la cual, dicha sustancia fue denominada *bradisinina* (BK), término proveniente de las raíces griegas: *bradys* que significa lento y *kinein*, movimiento (Bhoola et al., 1992). En 1960, Elliot y colaboradores aislaron el nonapéptido BK. Poco después, se comprobó que la calidina era un decapeptido, es decir, era la BK con un residuo adicional de lisina en el extremo terminal amino. Ambas sustancias son miembros de un grupo de polipéptidos con estructuras químicas y propiedades farmacológicas similares, de distribución muy amplia en la naturaleza. Se ha adoptado para todo el grupo el término genérico, donde la calidina y la BK son conocidas como cininas plasmáticas (Leeb-Lundberg et al., 2005). En 1980, Regoli y Barabé clasificaron los receptores de las cininas en receptores B₁ y B₂ y se sintetizó la primera generación de los antagonistas de dichos receptores (Regoli & Barabé, 1980). En las década de los 90 se sintetizó la segunda generación de los antagonistas selectivos de los receptores de las cininas, los cuales, han posibilitado ampliar el conocimiento sobre las acciones de las mismas (Leeb-Lundberg et al., 2005).

Diversos factores etiopatológicos, como son las lesiones tisulares, las reacciones alérgicas, las infecciones víricas y otros trastornos inflamatorios son responsables de la activación de una serie de reacciones proteolíticas que generan BK y calidina en los tejidos (Wachtfogel et al., 1993). Dichos péptidos son autacoides que actúan localmente produciendo dolor, vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y síntesis de prostaglandinas. De este modo, integran un subgrupo de un gran número de mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria (Kuhr et al., 2010). En los

últimos años, se han hecho descubrimientos importantes sobre las cininas y sus receptores. Así, los metabolitos de las cininas, considerados en épocas pasadas como inactivadores de productos de degradación, son ahora descritos como mediadores potentes de la inflamación y el dolor (Kuhr et al., 2010).

1.7.1. Síntesis y metabolismo de cininas

La BK es un péptido fisiológico y farmacológicamente activo que está formado por nueve aminoácidos, con un peso molecular bajo, aproximadamente 1060 Da ($C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$). Mientras que la calidina es un decapeptido, la misma cadena peptídica de la BK con un residuo adicional de lisina en el extremo terminal amino, por lo cual también es conocida, lisil-BK. Estas cininas tienen como principales precursores, los cininógenos. Se conocen dos formas de cininógeno en el plasma, cininógeno de alto (CEPM) y bajo (CEPR) peso molecular. Son sintetizados principalmente en los hepatocitos, pero también en las células endoteliales y en las células musculares lisas. La liberación de cininas a partir de sus precursores, se lleva a cabo por la acción de las proteasas de la serina, especialmente por las calicreínas, que son altamente específicas para la liberación de la BK y la calidina. Las calicreínas circulan en el plasma en su forma inactiva y deben de ser activadas por otras proteasas. Se conocen dos calicreínas que actúan en los cininógenos: la precalicreína plasmática y la calicreína tisular (Figura XII) (Bhoola et al., 1992).

El CEPM, cuando se encuentra en el plasma, está unido a la precalicreína plasmática y al factor XII (Kaplan et al., 2002). La precalicreína plasmática tiene un peso molecular aproximadamente de 88 kDa y tras su síntesis en el hígado, es desdoblada y activada por el factor XII, también conocido por *Factor de Hageman* o *Factor XIIIa* (proteasa que actúa por igual en las cascadas de coagulación intrínseca y en las cininas). El propio *Factor de Hageman* se encuentra normalmente en forma inactiva en el plasma y se activa por el contacto con las superficies con carga negativa como las del colágeno, las membranas basales, los lipopolisacáridos bacterianos, los productos plaquetarios, los cristales de urato, etc. El contacto con las superficies cargadas negativamente favorece la interacción de la precalicreína y el factor XII, lo que lleva a la formación de cinina, separándose la BK de las moléculas de CEPM por la acción de la enzima, que actúa en dos puntos para liberar el nonapéptido. La calicreína también puede activar el sistema del complemento y convertir el plasminógeno en plasmina. La

síntesis de cininas es activada por los fragmentos proteolíticos provenientes del *Factor XIIIa*, a su vez, la formación de estos fragmentos a partir del *Factor XIIIa* es catalizada por la plasmina y por el *feedback* positivo, y por la propia calicreína (Figura XII) (Bhoola et al., 1992; Kuhr et al., 2010).

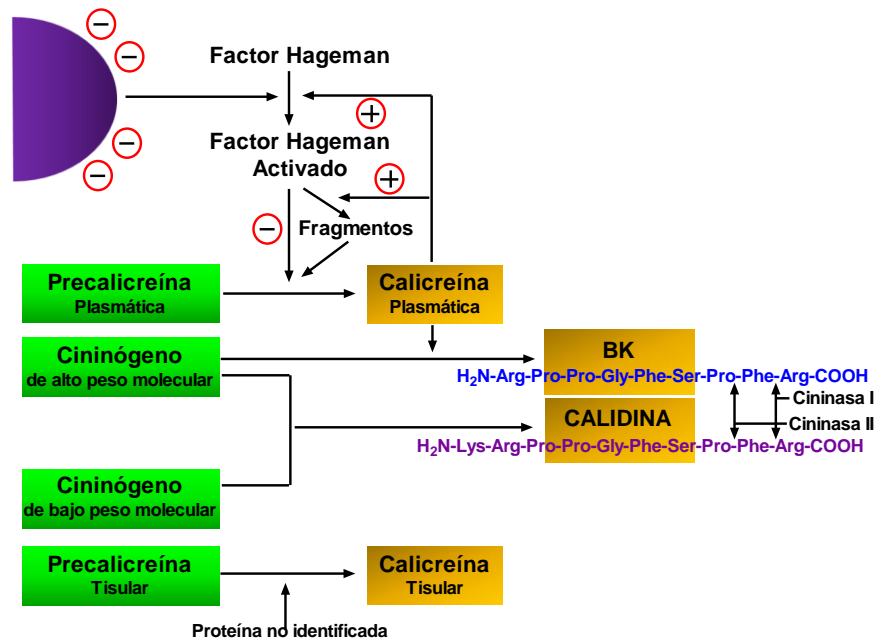


Figura XII **Síntesis y degradación del sistema calicreína-cininas**. La cascada que da origen a las cininas se inicia por la activación del *Factor de Hageman* de la vía intrínseca de la coagulación, mediante su contacto con superficies cargadas negativamente. Se produce un fragmento (*Factor XIIIa* o *Factor de Hageman* activado) que convierte la precaliceréina plasmática en calicreína. Dicha enzima fragmenta el cininógeno de alto peso molecular, esta molécula también actúa como cofactor en la activación del *Factor de Hageman*, dando lugar a la formación de la BK. El CEPM es fragmentado por las calicreínas plasmática y tisular, produciendo la BK y la calidina, respectivamente. El CEPR solo es fragmentado por la calicreína tisular, produciendo la calidina. Las cininasas del tipo I retiran la Arg terminal de la BK o de la calidina. Las cininasas del tipo II liberan el dipéptido C-terminal Phe-Arg de la BK o el correspondiente de la calidina. Adaptación de (Goodman Gilman, 2003).

La calicreína tisular es una proteína más pequeña que la plasmática. Es sintetizada en varios tejidos como glándulas sudoríparas y salivares, SNC, Sistema Cardiovascular, Sistema Gastrointestinal, Sistema Renal y Sistema Génitourinario. La calicreína tisular puede actuar en ambos cininógenos, dando origen a la calidina, mientras que la calicreína plasmática solo actúa en el CEPM, a partir del cual, se forma

la BK (Figura XII) (Kuhr et al., 2010). La actividad de la calicreína plasmática está regulada por los inhibidores de las proteasas de serina (2-macroglobulina, antitrombina III, inhibidor C1), mientras que la 1-antitripsina y la *kallikrein-binding protein* inhiben la calicreína tisular (Leeb-Lundberg et al., 2005).

La calidina tiene una actividad similar a la BK y no es imprescindible su transformación en BK para generar acciones biológicas. De hecho, a menudo se produce una conversión moderada de calidina en BK conforme la aminopeptidasa plasmática separa el residuo de lisina en la terminación amino, aunque dicha reacción es lenta en comparación con la velocidad de inactivación por la hidrólisis en la terminación carboxilo (Leeb-Lundberg et al., 2005).

Las cininas en la circulación sanguínea presentan concentraciones muy bajas que oscilan entre 0.2-7.1 pM y una semi-vida media muy breve entorno a los 15 segundos debido a la alta actividad hidrolítica de las cininasas (Pellacani et al., 1992). Las cininasas de Tipo I son la carboxipeptidasa N plasmática N (CPN) y la carboxipeptidasa M unida a la membrana (CPM). Ambas enzimas separan el residuo de arginina en la terminación carboxilo y así forma des-Arg⁹-BK y des-Arg¹⁰-calidina, las cuales, son agonistas potentes de los receptores de la BK, B₁. Las cininasas Tipo II comprenden la endopeptidasa neutra (EPN) y la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), que liberan el dipéptido C-terminal Phe⁸-Arg⁹ de la BK o el correspondiente de la calidina. La EPN también escinde el tripéptido Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷ de la BK o el correspondiente de la calidina, mientras que la ECA retira el dipéptido Ser⁶-Pro⁷ del residuo terminal anterior. Otras cininasas son las aminopeptidasas M (AmM) y P (AmP), que escinden la Lys¹ de la calidina y el enlace Arg-Pro de las cininas, respectivamente. Aunque las cininasas actúan rápidamente inactivando las cininas (la BK es degradada en un 80-90% en el pulmón), la formación y liberación continuada de calicreína tisular y plasmática mantiene un control eficaz en la producción de las cininas (Hillmeister & Persson, 2012).

1.7.2. Receptores de BK

Se han caracterizado dos subtipos de receptores de la BK (B₁ y B₂) que poseen siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. El receptor B₁ fue definido inicialmente como el responsable de contracción de la aorta aislada de conejo, presenta una elevada afinidad de conjugación por los metabolitos des-Arg de las cininasas (des-

Arg⁹-BK y des-Arg¹⁰-calidina). Su expresión proteica es inducida por citocinas como la interleucina-1 (IL-1) en la inflamación y/o lesión tisular. Está constituido por 353 aminoácidos y posee una homología del 36 % con la secuencia aminoacídica del receptor B₂. Este receptor, que posee 364 aminoácidos y se encuentra altamente glucosilado, se expresa de forma constitutiva y participa en la mayoría de los efectos de la BK y de la calidina (Leeb-Lundberg et al., 2005). Ambos receptores de BK, acoplados a proteínas G, activan a las fosfolipasas A₂ y C. La activación de la PLC favorece la hidrólisis de los fosfatidilinositoles de la membrana produciéndose el paso de PIP₂ a IP₃, llevando a la liberación de Ca²⁺ desde el RS y entrada de Ca²⁺ extracelular, elevándose el Ca²⁺ citosólico y DAG y, con ello, activación de la PKC. La BK activa a la PKC dependiente e independiente de Ca²⁺ (Tippmer et al., 1994). Por otro lado, la estimulación de la PLA₂ del citosol incrementa la liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana. El ácido araquidónico liberado puede ser metabolizado a una gran variedad de potentes mediadores inflamatorios (Leeb-Lundberg et al., 2005).

Los genes que codifican los dos tipos de receptores de BK se encuentran en el mismo cromosoma en la especie humana. Los ratones transgénicos con déficit de receptores B₂ son hipertensos y presentan una respuesta desproporcionada a la ANG II o a la ingesta de sal en la dieta y, adicionalmente desarrollan insuficiencia cardíaca con la edad. Por otro lado, los ratones transgénicos con déficit de receptores B₁ son normotensos y menos sensibles a estímulos dolorosos de diversa índole y presentan una reducida migración leucocitaria hacia los tejidos inflamados (Leeb-Lundberg et al., 2005; Maurer et al., 2011).

1.7.3. Antagonistas de receptores de BK

Los primeros antagonistas de la BK fueron agonistas parciales y con semividas muy cortas por su elevada tasa de degradación enzimática. En los comienzos del decenio de 1990, se sintetizaron antagonistas más selectivos y de acción más larga al sustituir aminoácidos sintéticos en posiciones clave (Sawutz et al., 1994).

Los antagonistas selectivos de los receptores B₂, icatibant (HOE 140) y deltibant (CP-0127), pertenecen a una segunda generación de antagonistas de naturaleza peptídica. El antagonista icatibant ha sido propuesto en la terapia de alergopatías, pancreatitis aguda, shock endotóxico, dolor postoperatorio y asma alérgica (Wirth et

al., 1991; Breil et al., 1995; Hirayama & Kayakiri, 2002), mientras que antagonistas selectivos del receptor B₁ como des-Arg HOE 140 y des-Arg⁹ [Leu⁸]-BK y antagonistas para ambos subtipos como el [D-Arg⁰, Hyp³, D-Phe⁷]-BK, han sido propuestos en el tratamiento de infecciones por rinovirus, dolor en quemados y asma alérgica, aunque no se ha podido contrastar su posible utilidad terapéutica (Cole & Lundquist, 2013).

1.7.4. Acción fisiológica y fisiopatológica de la BK

La BK produce vasodilatación y un aumento de la permeabilidad vascular través de su unión a los receptores B₁ y B₂. Ambos subtipos se encuentran en el endotelio y musculatura lisa vascular mediando efectos vasodilatadores y/o vasoconstrictores dependiendo de la localización de los mismos en la pared vascular (Bagate et al., 2001; Schaeffer et al., 2001). Así, la estimulación de receptores B₁ y B₂ localizados en la musculatura lisa vascular produce vasoconstricción, mediado por la proteína G_q y activación de la fosfolipasa C, y/o mediado por la proteína G_i, a través de la inhibición de la vía de la adenilato ciclasa, incrementando, así, la [Ca²⁺]_i (Dalsgaard et al., 2009). La unión de la BK a los receptores localizados en el endotelio vascular produce vasodilatación mediada por las vías del NO/GMPc y de la COX/AMPc (Loiola et al., 2011).

Los componentes del Sistema Calicreína-Cininas tienen un importante potencial terapéutico en la hipertensión (Marketou & Vardas, 2012). Este sistema está íntimamente relacionado con la ECA, la cual, degrada la BK en ANG II (Wang et al., 2010). La ANG II tiene un efecto vasoconstrictor, por lo que puede causar lesiones en diferentes órganos, promoviendo la ateromatosis arterial y aumentar la liberación de catecolaminas y la actividad del SNS (Vlasova et al., 2010), por lo que la inhibición de la ECA, lleva a una estabilización de los niveles de BK produciendo efectos cardioprotectores (Dahl et al., 2011).

La BK provoca ardor y dolor intenso con espasmo de la musculatura lisa intestinal y bronquial (Maurer et al., 2011). La respuesta contráctil generada es lenta y mantenida en comparación con la producida por la histamina. Asimismo, la BK estimula las APSC induciendo la liberación de neuropéptidos, como la SP, la NKA y el CGRP. En el SNC se han identificado todos los componentes del Sistema Calicreína-Cininógeno-Cinina, y los receptores B₁ están involucrados en numerosas patologías

del SN (inflamación y hemorragia intracerebral, enfermedades neurodegenerativas, tumores cerebrales, etc) (Maurer et al., 2011).

La liberación de la BK por la calicreína tisular puede ser importante para controlar el flujo sanguíneo en determinadas glándulas exocrinas y por consiguiente, regular la secreción de las mismas. Además, la BK estimula el transporte iónico y los procesos secretores en el epitelio digestivo y respiratorio y de la vesícula biliar. Debido a ello, un exceso de síntesis de BK favorece la presentación de diarreas en muchas enfermedades gastrointestinales y el incremento de la secreción nasofaríngea en la rinitis alérgica (Van Schoor et al., 2000). Asimismo, la BK, vía conjugación con receptores B₁, los cuales, están sobreexpresados, actúa como agente proinflamatorio (Duchene & Ahluwalia, 2009). No obstante, su papel en la inflamación y en la alergia no está totalmente esclarecido debido a que sus efectos forman parte, con frecuencia, de una cascada compleja de acontecimientos que incluyen otros mediadores. En diversos cuadros inflamatorios crónicos, se han detectado concentraciones elevadas de cininas, como ocurre en la rinitis causada por la inhalación de antígenos y la que se produce en la infección por rinovirus. Asimismo, las cininas desempeñan un papel esencial en el desarrollo del angioedema hereditario, en la gota, la coagulación intravascular diseminada, la enteropatía inflamatoria, la artritis reumatoide y el asma (Kaplan et al., 2002).

Diversos estudios han sugerido la participación de las cininas y sus receptores en la fisiopatología del Tracto Urinario, especialmente en el detrusor (Bascands et al., 2003; Chopra et al., 2005; Sand & Michel, 2014). En la vejiga urinaria, la expresión del receptor B₂ está demostrada en el músculo y en el urotelio (Chopra et al., 2005; Forner et al., 2012) y la activación de dicho receptor produce contracción del detrusor (Bellucci et al., 2007). Asimismo, receptores B₂ desempeñan un importante papel en los cuadros de cistitis y de vejigas hiperactivas de ratas con lesión medular (Forner et al., 2012). En este caso, la liberación de cininas es capaz de sensibilizar directamente las APSC de la vejiga urinaria a través de la estimulación del receptor B₂ y de ese modo inducir la liberación de ATP y de otros neurotransmisores. Esta secuencia de acontecimientos es responsable del desarrollo de la inflamación y los cambios en el tono de la pared vesical (Chopra et al., 2005; Forner et al., 2012). La expresión de los receptores B₁ en el detrusor se produce en procesos patológicos como la cistitis. La estimulación selectiva de dicho receptor *in vitro* induce la liberación de mediadores que, a su vez, actúan

sobre las fibras aferentes, causando, en consecuencia, la contracción del detrusor (Sand & Michel, 2014).

Las cininas plasmáticas promueven una vasodilatación, diez veces más potente que la inducida por la histamina, de las arterias del músculo esquelético, renales, coronarias y cerebrales a través de la activación de receptores B₂ (Maurer et al., 2011). Sin embargo, en los grandes vasos de conducción, las cininas producen contracción mediada vía receptores B₁ (Gavras, 1992). Asimismo, estimulan la liberación de histamina en los mastocitos y actúan, de forma similar, a factores angiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular, ya que son capaces de incrementar la permeabilidad microvascular, inducir vasodilatación y estimular la liberación de NO y de PGs (Madeddu, 1993).

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina incrementan los niveles de cininas plasmáticas y tisulares. De hecho, el potencial terapéutico de dichos inhibidores, referido a la disminución de la hipertrofia ventricular izquierda y la isquemia cardiaca, estaría relacionado con su capacidad de incrementar las concentraciones plasmáticas de las cininas (Dahl et al., 2011). En este sentido, se ha postulado que agonistas de los receptores de las cininas podrían ser de utilidad en el tratamiento de las enfermedades vasculares obstructivas, mientras que el empleo de antagonistas de dichos receptores podría ser valiosa en la terapia de la angiogénesis asociada al cáncer y a los procesos inflamatorios crónicos (Linz et al., 1992).

1.8. FOSFODIESTERASAS (PDEs)

Las PDEs son metalohidrolasas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos a sus correspondientes 5'-nucleósidos monofosfato en presencia de cationes divalentes. Estas enzimas pueden ser específicas de AMPc, GMPc o bien pueden utilizar ambos sustratos. La actividad de las PDEs fue descrita, por primera vez, poco tiempo después del descubrimiento del AMPc (Rall & Sutherland, 1958). En la década de los 70, ya se tenía conocimiento de una gran diversidad de PDEs sobre la base de su afinidad por el AMPc o el GMPc (Thompson & Appleman, 1971).

Las PDEs comparten una estructura muy similar que comprende tres dominios: un extremo amino (NH_2), una región conservada o dominio catalítico y un extremo carboxilo (COOH). El dominio catalítico es una región de 270 aminoácidos altamente conservada entre los miembros de una misma familia y localizada cerca del extremo COOH . Dicha región posee los elementos específicos de cada familia, responsables de las diferencias en la afinidad por el sustrato y en la sensibilidad a distintos inhibidores. Próximo al centro catalítico y al extremo NH_2 se encuentra el dominio regulador, que presenta mayores diferencias en tamaño y estructura entre las diferentes PDEs (Heikaus et al., 2009; Ke et al., 2011). Se han identificado 11 familias de PDEs (PDE1-PDE11), las cuales, son clasificadas sobre la base de su secuencia aminoacídica, propiedades bioquímicas, sensibilidad a inhibidores, mecanismos reguladores y afinidades por el AMPc y/o el GMPc. Así, las PDE 5, 6 y 9 son selectivas para el GMPc, las 4, 7 y 8 para el AMPc, mientras que las PDE 1, 2, 3, 10 y 11 pueden inactivar ambos nucleótidos (Figura XIII) (Uckert et al., 2006; Omori & Kotera, 2007).

Las PDEs desempeñan un papel fundamental en la transducción de señales, por lo que inhibidores de las PDEs, representan una diana farmacológica ideal para regular las concentraciones intracelulares de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. El hecho de que las diferentes familias de las PDEs tengan secuencias únicas en los dominios catalíticos y reguladores, y un patrón de expresión selectivo, ofrece la posibilidad de modular la actividad de los isoenzimas individuales usando fármacos específicos (Uckert et al., 2013). Los inhibidores de las PDEs se clasifican en 2 grandes grupos: inhibidores de PDEs no selectivos de primera generación, entre los que destacan las metilxantinas (cafeína, teofilina o papaverina), e inhibidores de segunda generación con mayor afinidad y selectividad por las diferentes familias de PDEs. Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores de la PDE5 (vardenafilo, sildenafil y tadalafilo)

utilizados en la terapia de la disfunción eréctil (Bruziches et al., 2013) y de la PDE4 (cilomilast y roflumilast) que están indicados en el tratamiento de patologías de la ventilación pulmonar obstructiva, como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Chong et al., 2011; Diamant & Spina, 2011), o el rolipram, inicialmente utilizado como agente antidepresivo (Fujita et al., 2012).

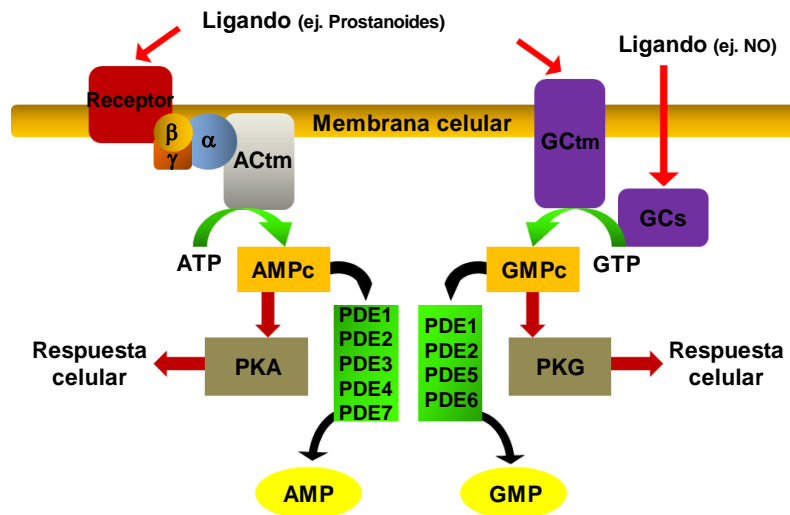


Figura XIII **Mecanismo de acción de las PDEs.** Ligandos, como los prostanoides o el NO, vía acoplamiento a receptores de membrana o difusión a través de la misma, activan a la adenilato y guanilato ciclasas, respectivamente, favoreciendo así, la formación de AMPc y GMPc a partir del ATP y GTP. Estos segundos mensajeros intracelulares, vía activación de las proteínas cinasas respectivas inducen la respuesta celular (vasodilatación). Las PDEs limitan los efectos de los ligandos mediante la degradación del AMPc y GMPc a las formas inactivas AMP y GMP, por lo que la inhibición de las PDEs incrementa la respuesta celular inducida por los ligandos (prostanoides y/o NO). Adaptado de (Ghofrani et al., 2004).

1.8.1. Fosfodiesterasas 4 y 5 (PDE4 y PDE5)

La PDE4 se caracteriza por mostrar una elevada afinidad por el AMPc y una muy baja o nula afinidad tanto por calmodulina como por el GMPc, pudiendo ser considerada insensible a estas moléculas. Esta familia de PDEs está representada por cuatro genes (PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D) que producen una gran variedad de isoformas que pueden ser solubles o estar asociadas a membrana. Los cuatro genes se expresan específicamente en determinados tipos celulares, y presentan diferencias en su actividad, distribución intracelular y regulación. Sin embargo, todas las isoformas

de esta familia son inhibidas selectivamente por el rolipram y sus derivados (Houslay & Adams, 2003; Gavalda & Roberts, 2013).

La primera generación de los inhibidores de la PDE4, como el rolipram, son agentes bien caracterizados farmacológicamente. Estos compuestos presentan una elevada afinidad por el denominado “sitio de alta afinidad para rolipram”, presente en el córtex cerebral de la rata e implicado en los efectos adversos gastrointestinales (Pages et al., 2009). El *roflumilast* pertenece a una segunda generación de inhibidores selectivos de la PDE4, el cual, mantiene una elevada potencia en el sitio catalítico de la enzima PDE4, pero, en cambio, exhibe una menor afinidad por el “sitio de alta afinidad para rolipram”, lo que posibilita una menor frecuencia de aparición de efectos adversos gastrointestinales que los mostrados por los inhibidores de primera generación (Hatzelmann & Schudt, 2001; Pages et al., 2009).

El hecho de que el aumento del AMPc en las células inflamatorias sanguíneas se asocie, generalmente, con la supresión de los mediadores inflamatorios y que el isoenzima predominante en estas células es la PDE4 (con sus cuatro isoformas PDE4A-D), ha sido la base para desarrollar fármacos, inhibidores de la PDE4, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Pages et al., 2009). Diferentes estudios han demostrado la existencia de la PDE4 en los bronquios humanos (Cortijo et al., 1997) y en las células inflamatorias (monocitos/macrófagos, linfocitos T, eosinófilos y neutrófilos) (Cortijo et al., 1999), así como, la capacidad de los inhibidores de la PDE4 para interferir la transducción de señales en las células inflamatorias (Sanz et al., 2005). Los fármacos que aumentan los niveles intracelulares de AMPc son capaces de inhibir la inducción por las citocinas E-selectinas. De hecho, el rolipram inhibe la inducción de la expresión de dicha citocina en las células endoteliales de la microcirculación pulmonar humana (Sanz et al., 2005). Asimismo, el *roflumilast* reduce la adhesión y la migración de los leucocitos (principalmente neutrófilos) de las vénulas postcapilares mesentéricas, así como la expresión de las selectinas E y P (Sanz et al., 2007). Este inhibidor tiene un efecto antiinflamatorio de amplio espectro, actuando tanto sobre las células estructurales (fibroblastos, músculo liso, epitelio) como sobre las células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos, células T, eosinófilos), por lo que se utiliza como agente antiinflamatorio en la terapia sintomatológica de la EPOC (Giembycz & Maurice, 2014).

La PDE5, caracterizada por presentar una elevada especificidad por el GMPc y por contener sitios de unión de alta afinidad para este nucleótido, consta de un único

gen, el PDE5A (Smith et al., 2013). El GMPc está implicado en el control de la contracción de la musculatura lisa vascular, y debido a ello, la PDE5 está implicada en la vasoconstricción pulmonar y/o peneana. Se ha desarrollado un gran número de inhibidores selectivos para la PDE5, cuyo mecanismo de acción es el de competir con el GMPc por el centro catalítico del enzima (Huang & Lie, 2013).

1.8.2. Fosfodiesterasas en el Tracto Urogenital

En el Tracto Genital, los inhibidores de la PDE5, como el sildenafil, el vardenafil y el tadalafil, estimulan la vasodilatación de la musculatura lisa del pene favoreciendo la relajación del músculo liso de los cuerpos carvenosos, originando así, la erección peneana. En presencia de la estimulación sexual, inhibidores de las PDE5 producen erecciones más prolongadas y una mayor rigidez y tumescencia del pene en los pacientes con disfunción eréctil de causa orgánica (hipertensión, diabetes, dislipemias, lesión de la médula espinal), psicógena (depresión) o tras la prostatectomía radical (Huang & Lie, 2013; Smith et al., 2013). El sistema de señalización NO/GMPc/PDE5 se encuentra también ampliamente representado en el Tracto Urinario donde produce relajación del músculo liso de la base de la vejiga y apoptosis en el tejido prostático, por lo que inhibidores de las PDE5, como el sildenafil, vardenafil o tadalafil están indicados en la terapia del cuadro STUI asociado a la HBP (Andersson et al., 2007; Miller, 2013; Park et al., 2013).

En la vejiga urinaria del hombre están presentes los seis tipos de PDEs (PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE5 y PDE9), mientras que en el uréter humano solo se expresan las PDE1, PDE2, PDE4 y PDE5 (Wheeler et al., 2005; Uckert et al., 2006). Hay una gran coincidencia en la expresión de las diversas isoenzimas en los Tractos Urinario y Genital estando específicamente bien representada la familia de la PDE5 (Lin et al., 2013).

El Tracto Genital masculino comparte con las vías urinarias varios de sus principales componentes anatómicos, sistemas de regulación funcionales y patologías. De hecho, concurren con elevada frecuencia, en los mismos pacientes, trastornos como la disfunción eréctil y los STUI, en especial aquellos derivados de la HBP (Rahnama'i et al., 2013b). El uso de inhibidores de las PDEs, incrementa la formación de AMPc o el GMPc, segundos mensajeros responsables de la relajación de la musculatura lisa del Tracto Urinario y, posiblemente, de la apoptosis en el tejido prostático, por lo que

podrían ser de utilidad terapéutica en este tipo de patologías urinarias o procesos obstructivos ureterales (Andersson et al., 2007). Así, rolipram y el activador la adenilato ciclasa forskolina producen una relajación potente del uréter intravesical del cerdo (Hernández et al., 2004) y del hombre (Kuhn et al., 2000), por lo que inhibidores selectivos de la PDE4 podrían ser de utilidad terapéutica en cuadros obstructivos ureterales.

El AMPc y el GMPc desempeñan un trascendental en la relajación del detrusor y de la uretra, respectivamente, por lo que inhibidores de las PDE1, PDE4 y PDE5 fueron propuestos para el tratamiento de la vejiga hiperactiva y del STUI asociado a HBP (Andersson et al., 2007; Dmochowski, 2013; Yamaguchi, 2013). La PDE4 hidroliza el AMPc e inhibidores de dicho enzima reducen la hipercontractilidad característica de vejigas con obstrucción del flujo de salida (Longhurst et al., 1997; Xin et al., 2014). Estudios recientes revelaron que los niveles de ARNm de la PDE4 en la vejiga humana son los más altos entre los 24 tipos de tejido humanos, incluyendo los tejidos del SNC y del Sistema Cardiovascular (Xin et al., 2014). Cabe señalar que la PDE4 no tiene efectos significativos inotrópicos y lusitrópicos sobre el ventrículo humano, por lo que la inhibición selectiva de dicho enzima estimula la vía del AMPc en los miocitos de la pared vesical, regulando así, la contractilidad detrusoriana, sin un impacto significativo sobre la función cardíaca (Xin et al., 2014).

En el detrusor humano, el nivel del RNAm correspondiente a la PDE5 es el más alto entre todas las PDEs, seguido de la PDE1, siendo esta última, la única isoenzima que es activada por el complejo Ca^{2+} /calmodulina y todas las isoformas de PDE1 están predominantemente situadas en el citosol de la célula muscular lisa. La inhibición de la PDE1 con vimpocetina, relaja el detrusor de conejo, cerdo y del hombre (Xin et al., 2012), siendo dicho efecto mediado principalmente por la vía del AMPc a pesar de que la PDE1 hidroliza tanto AMPc y GMPc (Xin et al., 2012).

Aunque se han realizado muchos estudios preclínicos, hasta la fecha, sólo los inhibidores de la PDE1 y PDE5 han sido probados clínicamente en la disfuncionalidad vesical. El tratamiento con inhibidores de la PDE1 mejora la frecuencia miccional en pacientes con vejiga hiperactiva, mientras que la inhibición de la PDE5 alivia los síntomas del STUI asociada a la HBP y de la disfunción eréctil (Rahnama'i et al., 2013a). El tratamiento con sildenafil, un inhibidor de la PDE5, mejora el cuadro sintomatológico de STUI en pacientes con disfunción eréctil y en la hiperactividad vesical (Sairam et al., 2002; Andersson et al., 2007). Además, la combinación de un

inhibidor de la PDE5 y un antagonista de los receptores adrenérgicos α_1 , tiene una eficacia clínica superior a la monoterapia con cualquiera de los agentes. Por todo ello, inhibidores de las PDEs constituyen una alternativa terapéutica de gran valor en la disfuncionalidad motora del Tracto Urinario Inferior (Rahnama'i et al., 2013b).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El *Comité Internacional para el Estudio del Reflujo* define el reflujo vésicoureteral (RVU) como “*el paso retrógrado o contracorriente de la orina de la vejiga al uréter durante la micción*”. Dicha patología es frecuente en la población infantil hasta los 3 años con una prevalencia entorno al 2 % de los niños y suele acompañarse, en un 50 % de los casos, de infección de las vías urinarias (Sargent, 2000). Su forma de presentación es muy variada, pudiendo producirse como consecuencia de hidronefrosis, infecciones urinarias, malformaciones renales y/o extrarrenales y de alteraciones producidas durante el desarrollo embrionario. Asimismo, la disfuncionalidad del mecanismo esfintérico vésicoureteral se presenta en el 60 % de los niños cuyos padres tienen antecedentes clínicos (Sargent, 2000). La condición anatómica que previene la aparición de un reflujo es la unión uréterovesical con su dispositivo antirreflujo intacto. Durante el llenado, la presión intravesical prácticamente se mantiene inalterable y la descarga del bolo de orina desde el uréter intravesical se efectúa por una presión ureteral superior a la de la vejiga. Sin embargo, durante el vaciado, la contracción del trigono hace descender el meato urinario y situarlo contra la pared muscular, el hiato ureteral se cierra por contracción del detrusor y el trigono, y la presión intravesical comprime el uréter submucoso, por lo que cualquier cambio en la posición y forma del uréter en su trayecto intravesical altera dicho mecanismo antirreflujo (Tekgul et al., 2012).

Se han descrito dos formas de presentación (primaria y secundaria) de dicha patología. El RVU primario o idiopático se produce como consecuencia de una anomalía congénita de la unión uréterovesical producida por la laxitud del trigono, una deficiencia de las fibras musculares del uréter intravesical y/o un trayecto submucoso muy corto secundario a un meato urinario ectópico. Este cuadro suele desaparecer de forma espontánea con el crecimiento, especialmente en los primeros años de vida, por maduración de la unión uréterovesical y crecimiento en la longitud del uréter intravesical (Sjostrom et al., 2004). El RVU secundario está relacionado, sin embargo, con una alteración en la disposición anatómica del uréter distal producida como consecuencia de la lesión quirúrgica de los mecanismos valvulares ureterales, la esclerosis del detrusor y la vejiga neurogénica, procesos que cursan con parálisis parcial o total del detrusor y el trigono originando un vaciamiento incompleto de la vejiga, así como por anomalías congénitas de la unión uréterovesical, como sucede en el uréteroceles y/o en el uréter ectópico de implantación extravesical (Riyach et al., 2014). Mientras que el tratamiento del reflujo secundario corresponde a la etiología de base, la terapia del reflujo primario va dirigida a la profilaxis antibiótica, mediante la

administración de nitrofurantoína o cefadroxilo, con el objeto de mantener la orina estéril en espera de la resolución espontánea del mismo (Conway et al., 2007). La corrección quirúrgica está indicada cuando el tratamiento farmacológico fracasa, como consecuencia de infecciones urinarias recurrentes y/o por mala tolerancia a la medicación, o en el caso de reflujos masivos (Baek & Kim, 2013; Dinckan et al., 2013).

El cólico renal es producido como consecuencia de la obstrucción ureteral aguda, parcial o completa, originada, en la gran mayoría de los casos (hasta un 90 %), por el enclavamiento de un cálculo en la pared ureteral. En un 5-10 %, es debido a patologías urinarias no litiasicas, como es el denominado *Síndrome de la Unión Pieloureteral*, producido por la presencia de coágulos por tumoraciones renales, atonía ureteral por pielonefritis, necrosis papilar y/o neoplasias uroteliales. El cólico renal está considerado una urgencia urológica frecuente ya que comporta una de las formas más angustiantes de dolor, por lo que requiere un rápido diagnóstico y tratamiento. Se estima que más de 12 % de la población sufrirá un cólico renal durante su vida, siendo la tasa de recurrencia alrededor de un 50 % (Shokeir, 2001). El tratamiento conservador es la primera línea de actuación del cólico renal simple, ya que dos tercios de las litiasis ureterales son expulsadas espontáneamente en las 4 semanas siguientes al inicio de la sintomatología. Los objetivos del tratamiento son establecer un buen control del dolor, y conservar al máximo la función renal suprimiendo o aliviando los efectos de la obstrucción ureteral (Miller & Kane, 1999).

La *Sociedad Internacional de Continencia (ICS)* define a la Incontinencia Urinaria (IU) como: *“la pérdida involuntaria de orina a través de la uretra, objetivamente demostrable y que constituye, para la persona que lo sufre, un problema higiénico y social”*. Este proceso afecta a todos los grupos de población, edad y sexo. Así, estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos en el año 2000 revelaban que el 55 % de mujeres y el 34 % de hombres mayores de 60 años, así como, un 42 % de mujeres y un 5 % de hombres menores de 60 años padecían diferentes grados de IU con un tratamiento de elevado coste económico (presupuesto anual de 19 billones de dólares) (Hu et al., 2004). En España, el gasto en absorbentes en 2001 fue de 197 millones de euros, lo que representa un 3.2 % del importe total de la prestación farmacéutica del Sistema Nacional de Salud. A pesar del considerable impacto negativo sobre la calidad de la vida de las personas que lo padecen, como consecuencia de la relación existente entre incontinencia, ansiedad y depresión, solamente un 20 % de los individuos afectados solicitan consulta médica. Las IU de estrés Tipo III se producen por disfuncionalidad

del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto de forma permanente (Coyne et al., 2013). Dicha patología afecta primordialmente a la población femenina constituyendo la forma más grave de incontinencia urinaria, la de mayor frecuencia de presentación en postoperatorios de intervenciones quirúrgicas retropúbicas (cirugías ginecológicas) y también en varones tras cirugías prostáticas, con terapias farmacológicas de escasa eficacia en las que se utilizan esencialmente agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 e inhibidores de la recaptación de 5-HT (duloxetina) para producir contracción de la base de la vejiga urinaria (Cannon et al., 2003).

El conocimiento de la naturaleza de los transmisores y/o moduladores, así como de los mecanismos involucrados en la tensión del músculo liso del uréter intravesical y del cuello de la vejiga urinaria es esencial en aras a desarrollar una correcta intervención terapéutica en los cuadros de RVU, patologías obstructivas ureterales e IU de estrés tipo III. De hecho, la existencia de un cierre incompleto de la unión uréterovesical y de un cuello abierto, de forma continuada, estaría relacionada con el desarrollo de RVU e IU producida por deficiencia esfintérica intrínseca, respectivamente (de Groat, 2006; Tekgul et al., 2012).

En relación a la regulación del Sistema Nervioso Autónomo, diferentes mediadores inhibidores no adrenérgicos no colinérgicos, como el NO, el VIP y el ATP han sido propuestos como responsables de la regulación nerviosa sobre la tensión de la musculatura lisa del uréter intravesical y del cuello vesical (Andersson & Arner, 2004; Kanai & Andersson, 2010). De hecho, el NO, es el principal neurotransmisor inhibidor del uréter intravesical, produciendo relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos dependientes de la guanilato ciclasa soluble involucrando la activación de canales K_{ATP} del plasmolema (Hernández et al., 1995a; Hernández et al., 1995b). Asimismo, en el cuello de la vejiga, el NO, cuya liberación desde nervios intramurales es modulada por canales Kv y receptores adrenérgicos α_2 , de localización presináptica, desempeña un papel clave en la transmisión inhibidora produciendo relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos neuronales y no neuronales (Hernández et al., 2007; Hernández et al., 2008). El ATP, la 5-HT y péptidos, como el VIP y el PACAP, desempeñan, asimismo, un papel crucial en la transmisión inhibidora del cuello vesical. El ATP produce relajación del cuello vesical a través de los receptores purinérgicos $P2Y_1$ y A_{2A} después de la hidrólisis del ATP a ADP y adenosina, respectivamente (Hernández et al., 2009), mientras que la 5-HT, cuyo efecto es modulado por los receptores 5-HT_{1A} presinápticos, produce la relajación vía receptores

musculares 5-HT₇, acoplados a la vía de la PKA, sin involucrar activación de los canales de K⁺ de membrana (Recio et al., 2009). El PACAP y el VIP producen relajación del cuello de la vejiga urinaria del cerdo a través de receptores musculares del subtipo VPAC₂, acoplados a la vía de la PKA, y de los receptores PAC₁ localizados en las aferentes sensoriales sensibles a la capsaicina (APSC) y acoplados a la liberación del NO, y de los receptores VPAC inhibidores situados en las terminaciones nerviosas motoras (Hernández et al., 2006). Recientemente, nuestro grupo ha desvelado la implicación del H₂S, sintetizado por la enzima cistationina-γ-liasa (CSE), como potente molécula gaseosa señalizadora en la neurotransmisión inhibidora del cuello vesical, produciendo la relajación de la musculatura lisa por la activación directa de canales K_{ATP} de membrana y promoviendo, de forma indirecta, la liberación de neuropéptidos inhibidores como el PACAP y el CGRP desde las APSC (Fernandes et al., 2013a; Fernandes et al., 2013b).

La bradicinina (BK), metabolito del Sistema Calicreína-Cinina, es un potente mediador de la inflamación, produciendo dolor, vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y contracción de la musculatura lisa (Moreau et al., 2005; Maurer et al., 2011). La acción de la BK se produce por su conjugación a los receptores B₁ y B₂ (Regoli et al., 1998), los cuales, desempeñan un papel clave en la regulación de la tensión del músculo detrusor, a través de la estimulación de los nervios sensoriales y la liberación de prostanoïdes derivados de la vía de las ciclooxigenasas (Meini et al., 2010; Arms & Vizzard, 2011).

Las fosfodiesterasas (PDEs) son enzimas esenciales en los mecanismos de señalización intracelular de las proteínas cinasas dependientes del AMPc (PKA) y GMPc (PKG) (Matsumoto et al., 2003; Wheeler et al., 2005). La inhibición de la PDE4 y PDE5 da lugar al incremento de las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc y consecuente activación de las cinasas respectivas, produciendo, en última instancia, la relajación del músculo liso (Matsumoto et al., 2003; Wheeler et al., 2005). La PKA y la PKG desempeñan un papel esencial en la relajación del detrusor y de la uretra, respectivamente, por lo que inhibidores de la PDE4 y PDE5 han sido propuestos para el tratamiento de la vejiga hiperactiva y del denominado cuadro sintomatológico del Tracto Urinario Inferior, respectivamente (Andersson, 2007; Hristov et al., 2011; Dmochowski, 2013; Yamaguchi, 2013).

A pesar del papel clave desempeñado por la BK y las PDEs en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del Tracto Urinario Inferior, existe una escasa

información referida a la acción ejercida por receptores B₁ y B₂ en el uréter intravesical y en el cuello de la vejiga, así como, por los inhibidores de la PDE4 en la región de salida de orina de la vejiga urinaria. Por todo lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo general desvelar la naturaleza de los neurotransmisores y/o neuromoduladores, independientes del NO, involucrados en la transmisión inhibitoria del uréter intravesical y cuello de la vejiga urinaria, en aras a proporcionar terapias farmacológicas efectivas en patologías de las vías urinarias como son el RVU, la obstrucción ureteral por enclavamiento de cálculos, la IU de estrés producida por deficiencia esfintérica intrínseca y el cuadro sintomatológico del Tracto Urinario Inferior secundario a la hiperplasia benigna de próstata. De forma específica, investigaremos la acción de la BK en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del uréter intravesical y del cuello vesical, así como, la relajación inducida por el inhibidor selectivo de la PDE4, rolipram, en comparación con la producida por los inhibidores de la PDE5 sildenafil y vardenafil, en el cuello de la vejiga del cerdo y del hombre. Así, utilizando diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western Blotting*, registro de fuerza isométrica y medida simultánea de tensión y $[Ca^{2+}]_i$), se estudiarán:

1º El papel desempeñado por la BK en la contractilidad de la musculatura lisa del uréter intravesical. Para ello se investigará la expresión de los receptores de B₁ y B₂ en la pared ureteral, la acción mediada a través de dichos receptores de localización pre y postsináptica sobre la tensión de la musculatura lisa ureteral, así como, la señal de transducción acoplada.

2º La acción ejercida por la BK en la contractilidad de la musculatura lisa del cuello de la vejiga. Para ello se investigará la expresión de los receptores de B₁ y B₂ en la pared vesical, la acción mediada a través de dichos receptores sobre la tensión de la musculatura lisa y mecanismo de señalización intracelular, así como, la modulación ejercida sobre la neurotransmisión inhibitoria.

3º La relajación inducida por los inhibidores de la PDE4 en el cuello de la vejiga del cerdo y del hombre. En este caso, se estudiará la expresión de la PDE4 en la pared del cuello vesical, así como, la potencia relajante exhibida por el inhibidor de la PDE4, rolipram, con respecto a la obtenida con los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafil.

3. MATERIAL y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material biológico

En el presente estudio se han utilizado vejigas de cerdos sanos adultos, de ambos sexos, sin alteraciones en el Tracto Urinario, obtenidas en el Matadero Madrid Norte S.A., extraídas inmediatamente después del sacrificio de los animales. Asimismo, se han utilizado vejigas humanas procedentes de donantes de órganos para trasplante, las cuales, fueron proporcionadas por el Servicio de Urología del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, previo consentimiento familiar y bajo la supervisión del Comité Ético de dicho hospital. Dichas vejigas fueron cuidadosamente introducidas en termos conteniendo una solución fisiológica salina (SSF) a 4° C siendo posteriormente transportadas hasta el Laboratorio para el Estudio del Músculo Liso de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

3.1.2. Material de laboratorio

3.1.2.1. Instrumentación general

- . Balanza de precisión *Sartorius* (Goettingen, Alemania).
- . Agitadores magnéticos *Vortek* (Estados Unidos).
- . pHmetro *Crison* (Barcelona, España).
- . Sistema de filtración *Mili-Q®* (Billerica, MA, Estados Unidos).
- . Termostato de inmersión *Braun*, modelo *Thermomix 1420* (Melsungen, Alemania).

3.1.2.2. Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting

- . Placas de 96 pocillos para la lectura de absorbancia (*Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates*, Fisher Scientific SL, Madrid, España).
- . Lector de Microplacas para Absorbancia ELx808, (*Izasa S.A.*, Barcelona, España).
- . Membranas miniblots de PVDF Hybond™-P (*Amersham Biosciences Europe GMBH*, Barcelona, España).

- . Cubetas Miniprotean Cell 3 y generador de campo eléctrico para la separación proteica por electroforesis (*Bio-Rad laboratories S.A.*, Madrid, España).
- . Cubetas *Transblot*, sandwicheras perforadas, esponjas, papeles *Whatman* y generador de campo ortogonal para la transferencia proteica desde el gel a una membrana (*Bio-Rad laboratories*, Madrid, España).
- . Reactivos de revelado de las membranas *ECL kit* (*Amersham Biosciences Europe GMBH*, Barcelona, España).
- . Captura y digitalización de imágenes y Análisis densitométrico, Equipo *ImageQuant LAS 500* y software *ImageQuant TL 5.2*. (*GE Healthcare Europe GmbH*, Barcelona, España).
- . Agitadores con distintas velocidades para las membranas de *Western Blotting* (*Mini-Rocker Shaker MR-1*, *Boeco* y *Vitramax 100*, *Heidolph*, (*Izasa S.A.*, Barcelona, España).
- . Centrifugadora refrigerada 5810R (*Eppendorf Ibérica S.L.U.*, Madrid España).
- . pH- metro *Crison MicropH 2001* (*Crison Instruments S.A.*, Barcelona, España).
- . Agitador magnético *Agimicro* (*JP Selecta S.A.*, Barcelona, España).
- . Balanzas de precisión *Mettler DM460* y *AB204-S* (*Mettler-Toledo S.A.*, Barcelona, España).

3.1.2.3. Equipamiento para la identificación de proteínas por inmunohistoquímica

- . Portaobjetos *Thermo Scientific Superfrost® Plus* (Estados Unidos).
- . Cubreobjetos *Menzel-Gläser* (Alemania).
- . Agitador *Gyratory® Shaker-Model G2* (Estados Unidos).
- . Criostato *Leica CM1510 S* (Alemania).
- . Microscopio *Leitz Diaplan* (Alemania).
- . Filtro de microscopio para fluorescencia con longitud de onda entre 590 y 617 nm (*Leica*, Alemania).
- . Filtro de microscopio para fluorescencia con longitud de onda entre 495 y 519 nm (*Leica*, Alemania).
- . Filtro de microscopio para fluorescencia con longitud de onda entre 360 y 460 nm (*Leica*, Alemania).
- . Cámara fotográfica adaptada al microscopio *Leica DFC 300 FX* (Alemania).

3.1.2.4. *Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las preparaciones de músculo liso*

- . Microscópio *Leica Dialplan* (Wetzlar, Alemania).
- . Fuente de luz fría *Leica* (Wetzlar, Alemania).
- . Miógrafo *820MS DMT* de 4 canales para registro de tensión isométrica (Aarhus, Dinamarca).
- . Polígrafo *Grass*, modelo 79E con 6 canales intercambiables *Grass Instrument Co.* (Warwick, RI, Estados Unidos).
- . Polígrafo *Graphtec Multicorder MC 6621* con 4 canales intercambiables *Hugo Sachs Elektronik* (March-Hugstetten, Alemania).
- . Transductores de fuerza isométrica *Grass FT03C Grass Instrument Co.* (Warwick, RI, Estados Unidos)
- . Baños de órganos aislados de 5 ml de capacidad con la temperatura regulada a 37° C (Madrid, España)
- . Sistema de adquisición y análisis de datos *PowerLab 8/30 DMT* (Aarhus, Dinamarca)
- . Estimulador eléctrico *Cibertec CS 20* (Barcelona, España).

3.1.2.5. *Equipamiento para el registro simultáneo de la tensión y la $[Ca^{2+}]_i$*

- . Monocromador *DeltaRAM X* (*Photon Technology International*) utilizado para excitar a dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm) las preparaciones de músculo liso.
- . Sistema de detección fotomultiplicador 814 (*Photon Technology International*).
- . Lámpara ultravioleta de xenón *LPS-220B* (*Photon Technology International*).
- . Miógrafo microvascular *DMT simple* de 8 ml de capacidad con temperatura regulada (Aarhus, Dinamarca).
- . Microscopio de fluorescencia invertido *Zeiss, Axiovert S100 T* (*Photon Technology International*) con un objetivo para fluorescencia Olympus LUCPlanFLN 20x.

3.1.3. Reactivos

- . Bradicinina (BK), agonista de los receptores de BK (*Tocris*, Reino Unido).
- . HOE 140, antagonista selectivo de los receptores B₂ (*Tocris*, Reino Unido).
- . Lys-[Des-Arg⁹]calidina, agonista selectivo de los receptores B₁ (*Tocris*, Reino Unido).
- . R 892, antagonista selectivo de los receptores B₁ (*Tocris*, Reino Unido).
- . Fenilefrina (FE), agonista de los receptores adrenérgicos α_1 (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Atropina, antagonista de los receptores muscarínicos (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Guanetidina, neurotoxina adrenérgica (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Indometacina, inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX) (*Sigma*, Estados Unidos).
- . 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol (SC 560), inhibidor selectivo de la COX-1 (*Tocris*, Reino Unido).
- . N-[2-ciclohexiloxil-4-nitrofenil] metanosulfonamida (NS 398), inhibidor selectivo de la COX-2 (*Tocris*, Reino Unido).
- . N^G-nitro-L-Arginina (L-NOARG), inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NO) (*Sigma*, Estados Unidos).
- . 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona (ODQ), inhibidor selectivo de guanilato ciclasa soluble (*Tocris*, Reino Unido).
- . 1-[2-(4-methoxyphenyl)-2-[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]ethyl-1H-imidazole hydrochloride (SKF 96365), bloqueante no selectivo de los canales de Ca²⁺ (*Tocris*, Reino Unido).
- . Nifedipina, bloqueante de los canales VOC tipo L (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Trans-4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-4-pyridinylcyclohexanecarboxamide dihydrochloride (Y 27632) inhibidor de la vía de Rho/Rho-cinasa (*Tocris*, Reino Unido).
- . Iberiotoxina (IbTX), bloqueante selectivo de los canales BK_{Ca} (*Tocris*, Reino Unido).
- . 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM 34), bloqueante selectivo de los canales IK_{Ca} (*Tocris*, Reino Unido).
- . Apamina, bloqueante selectivo de los canales SK_{Ca} (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Glibenclamida, bloqueante selectivo de los canales K_{ATP} (*Tocris*, Reino Unido).
- . 4-aminopiridina (4-AP), bloqueante de los canales K_v (*Sigma*, Estados Unidos).
- . DL-propargylglycine (PPG), inhibidor de la sintasa de H₂S cistationina γ -liasa (*Sigma*, Estados Unidos).

- . ω -conotoxin GVIA (ω -CgTX), inhibidor de los canales VOC neuronales, (*Tocris*, Reino Unido).
- . (9R,10S,12S)-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-di indolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-[1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid (KT 5720), inhibidor de la proteína cinasa A (PKA) (*Tocris*, Reino Unido).
- . (S)-nitroso-Nacetylpenicillamine (SNAP), donante estable de NO (*Tocris*, Reino Unido).
- . Vardenafilo, inhibidor selectivo de la PDE5 (*Sigma*, Estados Unidos).
- . 1-[[3-(4,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazine citrate (sildenafil), inhibidor selectivo de la PDE5 (*Tocris*, Reino Unido).
- . 4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)pyrrolidin-2-one (rolipram), inhibidor selectivo de la PDE4 (*Tocris*, Reino Unido).

La indometacina y la nifedipina fueron disueltas en etanol al 96%. Glibenclamida, KT5720, NS 398, ODQ, PPG, rolipram, sildenafil, SC 560, SNAP, TRAM 34 y vardenafil, fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). Las otras sustancias fueron disueltas en agua bidestilada. Los solventes, a la concentración final, no excedieron el 0.1% del volumen total de los baños de órganos y no tuvieron efecto sobre la contractilidad de las preparaciones del uréter intravesical y cuello vesical.

3.1.4. Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con sales inorgánicas *Merck* de grado analítico, disueltas en agua desionizada de alta pureza *Mili-Q*.

3.1.4.1. Soluciones fisiológicas

. Solución salina fisiológica (SSF)

La composición de esta solución en mM fue:

· Cloruro sódico (NaCl)	119.00
· Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00
· Cloruro potásico (KCl)	4.60
· Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40

· Cloruro magnésico (MgCl_2)	1.20
· Cloruro cálcico (CaCl_2)	1.50
· Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027
· Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	11.00

La solución de la SSF se preparó a diario diluyendo los reactivos en agua desionizada y continua agitación. Previamente a la adición de CaCl_2 , se dejó airear la solución durante 20 min con carbógeno (95 % O_2 y 5 % CO_2) con el fin de optimizar el pH de la misma a 7.4. La adición de EDTA tuvo como objeto retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano en la solución.

. Solución salina fisiológica rica en potasio (SSFK)

Para preparar esta solución se sustituyeron cantidades equimolares de NaCl por KCl con respecto a la solución SSF normal. La composición de la SSFK en mM fue:

· Cloruro potásico (KCl)	119.00
· Bicarbonato sódico (NaHCO_3)	25.00
· Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	11.00
· Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1.40
· Cloruro magnésico (MgCl_2)	1.20
· Cloruro cálcico (CaCl_2)	1.50
· Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027

La SSFK se preparó a diario diluyendo los reactivos en agua destilada y continua agitación. Previamente a la adición de CaCl_2 se dejó airear la solución durante 20 minutos con carbógeno (95 % O_2 y 5 % CO_2) con el fin de optimizar el pH de la misma a 7.4.

. Solución salina fisiológica libre de Ca^{2+} (SFF^0)

La SFF^0 , se preparó a partir de una SFF sustituyendo el CaCl_2 por 0.1 mM de EGTA, un compuesto quelante del Ca^{2+} , o bien sin EGTA. La SFF^0 se preparó para el estudio de las fuentes de Ca^{2+} involucradas en la contracción inducida por la BK.

3.1.4.2. *Tampones utilizados para el Western blotting*

Los medios, tampones y soluciones utilizados fueron preparados con productos adquiridos en las casas comerciales *Sigma-Aldrich Química, S.L.* (Madrid, España), *Merck Farma y Química, S.A.* (Barcelona, España) y *Bio-Rad laboratorios, S.A.* (Madrid, España). El agua desionizada y bidestilada se obtiene del sistema de purificación de agua fue *Millipore MILLI-Q PLUS ZFMQ05001* (calidad > 18,2 Ω).

. Solución tampón de lisis para la extracción de proteínas

. SDS	1%
. Ortovanadato de sodio	1 mM
. Tris HCl	10 mM
. Antiproteasa (inhibidor de la proteasa P8340, <i>Sigma-Aldrich Química, S.L.</i> , Madrid, España).	

. Solución tampón de carga LAEMLI 5X

. Tampón Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 ml
. Glicerol (20 % v/v)	2 ml
. SDS 10 % (2 %)	2 ml
. Agua destilada	3 ml
. β -mercaptoetanol (5 mM)	0.5 ml
. Azul de bromofenol (p/v)	0.01 %

. Solución tampón de carga LAEMLI 5X

. Tampón Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	2.5ml
. Glicerol (20% v/v)	2 ml
. SDS 10% (2%)	2 ml
. Agua destilada	3 ml
. β -mercaptoetanol (5 mM)	0.5 ml
. Azul de bromofenol (p/v)	0.01%

. Solución tampón TRIS-HCl pH 8.8, 1.5 M

.Tris-HCl	18.171 g
-----------	----------

Ajustando el pH a 8.8 y enrasando hasta 100 ml con agua destilada desionizada.

. Solución tampón TRIS-HCl pH 6.8, 0.5 M

.Tris-HCl	6.057 g
-----------	---------

Ajustando el pH a 6.8 y enrasando hasta 100 ml con agua destilada desionizada.

*. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**Fase compactadora al 4 %*

. Agua destilada	2.25 ml
. Acrilamida 30 %	650 µl
. Tampón Tris-HCL 0.5 M pH 6.8	500 µl
. SDS (10 %)	40 µl
. APS (10 %)	40 µl
. Temed	4 µl

Fase separadora al 10%

. Agua destilada	4 ml
. Acrilamida 30 %	3.3 ml
. Tampón-Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
. SDS (10 %)	100 µl
. APS (10 %)	100 µl
. Temed	4 µl

. Solución tampón para la electroforesis 10X

. Tris-base (250 mM)	30 g
. Glicina (2.5 M)	144 g

Ajustando el pH a 8 con HCl y enrasando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

. Solución tampón de electroforesis 1X

. Tampón de electroforesis 10X	100 ml
. SDS 10 %	10 ml

Ajustando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

. Solución tampón de transferencia 10X

. Tris base (66 mM)	30 g
. Glicina (386 mM)	144 g
. SDS 20 % (0.1 % final) – 500 µl SDS	5 ml

Ajustando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

. Solución tampón de transferencia 1X:

. Tampón de transferencia 10X	100 ml
. Metanol (20 %) (v/v)	200 ml

Ajustando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

. Solución TBS-T 10X:

. Tris base (200 mM)	24.2 g
. NaCl (615 mM)	80 g
. Agua desionizada	800 ml

Ajustar el pH a 7.8

Ajustando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

. Solución TBS-T 1X:

. TBS-T 10X	100 ml
. Twen 20 (0.1 %)	1 ml

Ajustando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

. Solución de stripping

. Glicina (2 M)	150 g
. Agua desionizada	800 ml
. Tween 20 (1 %)	10 ml
. SDS 20 % (1 % final)	50 ml

Ajustar pH a 2.2

Ajustando a un volumen final de 1 l con agua desionizada.

3.1.4.3. Soluciones para la inmunohistoquímica

. Solución tampón fosfato 0.1 M (PB)

. Fosfato de sodio dihidrógeno (2-hidrato)	2.5 g
. Fosfato disódico hidrógeno (anhidro)	11.9 g
. Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7.4

. Solución para la preincubación

Para 10 ml:

. Suero normal de cabra (NGS) o Suero normal de burro (NDS)	1000 µl
. Tritón-100	30 µl
. PB	8970 µl

. Solución de anticuerpos

Para 10 ml de diluyente:

. NGS o NDS	200 µl
. Tritón-100	30 µl
. PB	9770 µl

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Disección de preparaciones de músculo liso del uréter y del cuello vesical

En nuestro laboratorio, las vejigas fueron situadas en *Placas de Petri* conteniendo una SFF a 4° C (Figura XIII). Posteriormente, se procedió a la eliminación de la grasa y tejido conjuntivo circundante y se realizó una incisión longitudinal desde la uretra hasta la inserción del ligamento umbilical en el cuerpo de la vejiga. Para la obtención de las preparaciones de uréter intravesical se procedió a la disociación del uréter de la pared de la vejiga internamente desde los orificios ureterales. Las muestras de cuello vesical se obtuvieron por microdisección de la musculatura lisa localizada por debajo del trígono y a 4-5 mm por encima de la uretra proximal. A continuación, se disecaron

tiras longitudinales pertenecientes al uréter intravesical y al cuello vesical de 4-6 mm de largo por 2-3 mm de ancho.



Figura XIII. **Identificación del uréter intravesical y cuello vesical para su microdisección.** Vejiga urinaria de cerdo en placa de Petri con SFF a 4° C bajo un microscopio *Leica Diaplan* y una fuente de luz fría *Leica*.

3.2.2. *Western blotting*

Preparaciones de músculo liso y de urotelio pertenecientes al uréter intravesical y cuello vesical fueron congeladas en N₂ líquido para la crioprotección hasta el momento de su homogenización. Dicho proceso se realizó manualmente en alícuotas *Eppendorf* donde fue recogida la muestra, manteniéndola sumergida en N₂ líquido durante el proceso de fricción mecánica, con una torunda de plástico, hasta convertirla en polvo. Posteriormente se adicionó tampón SDS de lisis (75 µl) individualmente a cada muestra, moliendo hasta la perfecta homogenización. A continuación, se centrifugaron las muestras a 14000 g a 4° C durante 20 min, recogiendo el líquido sobrenadante con todas las proteínas de membrana y citosólicas solubilizadas.

Se calculó la cantidad de proteína de cada muestra para conocer el volumen de cada una de ellas necesario para obtener 20 µg de proteína. Siguiendo el método *Lowry*, se realizaron curvas patrón de albúmina sérica bovina (BSA), con concentraciones crecientes conocidas (0.2 µg/µl; 0.5 µg/µl; 0.8 µg/µl; 1 µg/µl; 1.5 µg/µl y 2 µg/µl). Las soluciones patrón de BSA y las muestras se colocaron en alícuotas por duplicado de 5µl

en una placa de 96 pocillos, y se añadieron los reactivos que forman un complejo coloreado con las proteínas (*Bio Rad-DC Protein Assay Reagents*) y se determinó la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 575 nm. Una vez conocida la concentración proteica de cada muestra, se realizaron los cálculos tomando una cantidad de 35 µg de proteína para cada muestra, junto con 8 µl de solución tampón de carga *Laembi* (x5), y hasta 20 µl (cantidad de cada pocillo en el gel de electroforesis), con agua destilada. Tras la preparación de las muestras se procedió a la desnaturalización de las proteínas manteniéndolas a 95 ° C durante 10 min.

La separación de proteínas por peso molecular se realizó en geles de policacrilamida (*SDS-PAGE*) con fases compactadora al 4 % y separadora al 10 %, en donde se cargaron las muestras, a excepción de un pocillo por gel, en el que se colocó un patrón de peso molecular (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific™ Fisher Scientific*, Madrid, España). Los geles con las muestras cargadas se situaron en las cubetas de electroforesis cubiertos con una solución tampón de dodecil sulfato sódico (SDS) al 5 %, con una corriente de 370 mA, a 196 V, durante 50 min, en donde se separaron las proteínas en función de sus pesos moleculares, migrando más lejos aquellas de menor tamaño. Una vez separadas las proteínas, se procedió a la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa de difluoruro de polivinilo (*PVDF Hybond™- P, Amersham Biosciences Europe GMBH*, Barcelona, España) poniendo en contacto el gel y la membrana mediante un sistema de sandwicheras de plástico perforado, situadas en una cubeta con solución de transferencia 1X, obtenida a partir de la solución de transferencia 10X y situado entre dos electrodos planos diseñados para conseguir un campo eléctrico uniforme en toda la superficie y perpendicular al sistema membrana/gel, en dirección a la membrana. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. Este proceso provoca un gran calentamiento, por lo que las cubetas se sumergen en hielo para refrigerar el sistema. El voltaje aplicado para la transferencia fue de 110 V durante 1 h y 30 min. Tras la transferencia se obtuvieron las membranas con las proteínas separadas por su peso molecular, añadiendo *Rojo Ponceau S (Sigma)* en solución acuosa para comprobar la correcta transferencia, que ya tiñe todas las proteínas presentes en la membrana, lavando posteriormente con solución *TBS-T 1X* y en suave agitación hasta su completo lavado.

El siguiente paso consistió en el bloqueo de la membrana, con leche en polvo desnatada al 5 % en *TBS-T 1X*. Tras el bloqueo se procedió a la incubación con el

anticuerpo primario, específico para la proteína que se deseara detectar sobre la membrana (Tabla I), disueltos en solución BSA (5 %). La membrana se mantuvo expuesta al anticuerpo primario durante toda la noche, a 40° C y con agitación lenta. Para eliminar el anticuerpo primario no unido a proteínas, se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 min cada uno y con agitación rápida. A continuación, se expusieron las membranas al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), frente al animal de procedencia del anticuerpo primario (anti-conejo o anti-ratón) (Tabla II), manteniéndolo durante un mínimo de 1 h y 30 min, a T° ambiente y en agitación lenta. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados con TBS-T 1X de 10 min cada uno y con agitación rápida.

El revelado de las proteínas se realizó añadiendo sobre la membrana las soluciones del kit ECL (Amersham Biosciences Europe GMBH) según las instrucciones del fabricante. Este kit contiene luminol, sustrato quimioluminiscente, que reacciona con la HRP en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de su oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal reducida más estable emitiendo luz. La cantidad de luminiscencia obtenida es proporcional al anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario, que a su vez se une específicamente a la proteína, por lo que la señal obtenida nos da una información cualitativa de la proteína que se desea detectar. La cuantificación de la señal quimioluminiscente se realizó mediante análisis densitométrico de las membranas comparando el valor de las proteínas de interés con la señal obtenida de la β -actina, que es utilizada como control de carga. El análisis densitométrico del *Western blotting* se realizó con el equipo Imagequant LAS 500 y el software informático ImageQuant TL (GE Healthcare Europe GmbH).

Tabla I. Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blotting.

<i>Ac primario</i>	<i>Pm (kDa)</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>
Conejo anti-B ₁	33	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
Conejo anti-B ₂	43	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
Ratón anti- β -actina	43	1:7000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany

Tabla II. Anticuerpos secundarios utilizados en el *Western Blotting*.

<i>Ac secundario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>
Cabra anti-conejo HRP-conjugado	1:5000	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany</i>
Asno anti-ratón HRP-conjugado	1:10000	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany</i>

3.2.3. Inmunohistoquímica

Para el estudio inmunohistoquímico se utilizó un método de doble marcaje con fluorescencia. Las preparaciones de músculo liso y urotelio del uréter intravesical y de cuello de la vejiga fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato (PB) 0.1M y pH 7.4. Posteriormente fueron crioprotegidas sumergiéndolas en una solución de sucrosa al 30 % en PB. A continuación, el tejido fue congelado en una solución OCT (*Tissu-Tek®*, *Sakura Finetek Europe B.V.*) a -80° C hasta su utilización.

Con ayuda de un criostato se obtuvieron secciones transversales de 5 µm de espesor que se recogieron en portaobjetos y se almacenaron en un congelador a -4° C hasta que dio comienzo la reacción inmunohistoquímica en el portaobjetos. La reacción se inició con una preincubación, durante 3 h a T^a ambiente y con agitación suave, en una solución de suero normal de cabra (NGS) o suero normal de asno (NDS) al 10 % y 0.3 % de Tritón X-100 (TX-100) en PB. Esta preincubación permite preparar el tejido para la penetración de los inmunorreactivos, ya que disuelve las capas lipídicas de las membranas permitiendo pasar grandes moléculas, favoreciendo el inmunomarcaje en todo el grosor de la sección. Además, este paso permitió bloquear, mediante el suero normal, los distintos lugares inespecíficos de unión que pudieran ser reconocidos por los anticuerpos secundarios. Transcurrido el tiempo de la preincubación, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios específicos para las distintas proteínas que deseábamos detectar y un marcador neuronal de manera conjunta, en cámara húmeda durante un periodo de 48 horas a 4° C (Tabla III). Los anticuerpos fueron diluidos en una solución de bloqueo al 2 % de NGS o NDS y 0.3 % de TX-100 en PB. Los anticuerpos fueron escogidos teniendo en cuenta que sus correspondientes secundarios pertenecieran a distintas especies y tuvieran distintos espectros de emisión.

Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 min a T^a ambiente en PB, para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (fluoruro verde y fluoruro rojo) de forma conjunta como los anticuerpos primarios, en cámara húmeda durante 2 h a T^a ambiente (Tabla IV). La solución en la que se prepararon estos anticuerpos es la misma solución de bloqueo que la de los anticuerpos primarios. A continuación los cortes fueron lavados en PB para remover el exceso de anticuerpo secundario y se cubrieron con *Prolong® Gold antifade reagent* con DAPI.

Por último, se procedió a la observación de las preparaciones al microscopio en cámara oscura, aplicando filtros de diferentes longitudes de onda para visualizar los distintos anticuerpos y fueron fotografiadas gracias a un sistema de cámara adaptada al microscopio y a un ordenador que recogía las imágenes utilizando para ello el programa de tratamiento de imágenes *Adobe Photoshop CS2*.

Tabla III. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunohistoquímica.

<i>Ac primario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>
Conejo anti-B ₁	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany</i>
Conejo anti-B ₂	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany</i>
Cabra anti-PDE4	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany</i>
Ratón anti-PGP 9.5 (marcador neuronal)	1:50	<i>Abcam, Bristol, UK</i>

Tabla IV. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunohistoquímica.

<i>Ac secundario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>
<i>Alexa Fluor® 594</i> cabra-anti conejo (receptores B ₁ y B ₂)	1:200	<i>Abcam, Bristol, UK</i>
<i>Alexa Fluor® 594</i> asno-anti cabra (enzima PDE4)	1:200	<i>Abcam, Bristol, UK</i>
<i>Alexa Fluor® 488</i> cabra-anti ratón (marcador neural)	1:200	<i>Abcam, Bristol, UK</i>

3.2.4. Estudios funcionales

3.2.4.1. *Montaje y normalización de las preparaciones de uréter intravesical y cuello vesical*

Tiras longitudinales de 4-6 mm de largo y 2-3 mm de ancho de músculo liso del uréter intravesical y cuello vesical fueron montadas en baños de órganos aislados de 5 ml de capacidad conteniendo SFF a 37° C y aireada con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) para obtener un pH final de 7.4. Uno de los extremos de la preparación se conectó a un gancho metálico conectado a un transductor de fuerza isométrica, que recoge continuamente los cambios de tensión y los transforma en señales eléctricas, mientras que el otro extremo, se fijó a un gancho unido a un tornillo micrométrico que permite aplicar tensión activa a las preparaciones (Figura XIV). Tras un periodo de estabilización de 30 min, se procedió al estiramiento de las preparaciones de músculo liso, durante un periodo de normalización de 60 min, hasta la consecución de una tensión pasiva de 1.5 g.

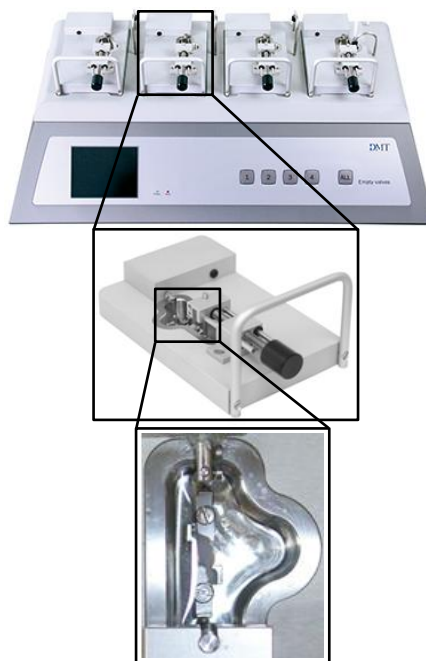


Figura XIV. Miógrafo 820MS DMT de 4 canales y detalle del montaje de una preparación longitudinal de músculo liso de cuello vesical.

3.2.4.2. *Procedimiento experimental*

Los experimentos fueron realizados en el mismo día y al día siguiente del sacrificio de los animales o de la extracción en los donantes de órganos, ya que se ha comprobado que la reactividad de las preparaciones de músculo liso no se ve comprometida pasadas 24 h, siempre y cuando estén mantenidas en SFF a 4° C.

Una vez montadas y normalizadas las muestras, se valoró su integridad funcional mediante la exposición a una SSFK (124 mM). Posteriormente, se realizaron tres lavados con SFF y una vez estabilizadas las muestras, se procedió a la realización de los diferentes protocolos experimentales.

Con el objeto de caracterizar las acciones de la BK y las vías de señalización involucradas en el músculo liso del uréter intravesical y del cuello vesical, se realizaron, sobre la tensión basal de las preparaciones, curvas concentración-respuesta (CCR) en dosis semilogarítmicas crecientes (0.1 nM – 30 μ M). La contracción inducida por BK fue reproducible en dos curvas consecutivas, motivo por el cual, se llevó a cabo en la misma preparación una CCR control, posteriormente lavados con SSF, cada 20 min, durante un periodo total de 90 min y a continuación, se incubaron los tratamientos específicos (antagonistas y/o inhibidores) durante un periodo de 30 min, previo a la realización de una segunda CCR de BK. Con objeto de investigar el papel del urotelio en la respuesta inducida por la BK, fueron realizadas CCR de BK en preparaciones ureterales y del cuello vesical con urotelio intacto y desprovistas de urotelio.

Para estudiar el papel de los receptores bradikinérgicos B₁ en la relajación del músculo liso del uréter intravesical y cuello vesical, se realizaron CCR de calidina, un agonista selectivo de los receptores B₁, en dosis semilogarítmicas crecientes (0.1 nM – 30 μ M) en preparaciones con urotelio intacto, en preparaciones precontraídas con U46619 (0.1 μ M) y FE (1 μ M), respectivamente. La relajación inducida por la calidina en el cuello vesical era reproducible en dos CCR consecutivas, por lo que fueron construidas, en la misma preparación, CCRs en ausencia y presencia de los bloqueantes específicos.

Con objeto de determinar las fuentes de Ca²⁺ responsables de la contracción del músculo liso del uréter intravesical y del cuello vesical inducida por BK, las preparaciones fueron contraídas con una dosis submaximal de BK (3 μ M). Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces a intervalos de 10 min y

seguido de un último lavado con SSF_0 . En dicha solución se volvieron a estimular las preparaciones con BK.

Para el estudio del papel de los receptores B_1 y B_2 en la neurotransmisión inhibitoria NANC, las preparaciones de músculo liso ureteral y del cuello vesical fueron tratadas con guanetidina ($10 \mu\text{M}$) y atropina ($0.1 \mu\text{M}$), bloqueante de la neurotransmisión adrenérgica y antagonista de los receptores muscarínicos, respectivamente, durante 60 min, siendo la SSF reemplazada a cada 20 min. Dicho tratamiento estuvo presente durante el desarrollo del experimento. Las preparaciones de músculo liso del uréter intravesical fueron previamente contraídas con el análogo del tromboxano U46619 ($0.1 \mu\text{M}$) y las del cuello vesical con el agonista de los receptores adrenérgicos α_1 FE ($1 \mu\text{M}$). Sobre el tono sostenido inducido por dichos agentes, se realizaron curvas de relajación dependientes de la frecuencia de estimulación eléctrica transmural (EET, 0.5 – 16 Hz, con pulsos rectangulares de 1 ms de duración, trenes de 20 s y una corriente de salida constante ajustada a 75 mA) a intervalos de 4 min. Para investigar el papel de dichos receptores en la neurotransmisión NANC independiente de NO, se incubaron las preparaciones con el inhibidor de la sintasa de NO, L-NOARG ($100 \mu\text{M}$). Además, en las preparaciones del uréter intravesical, se usó el inhibidor de la enzima de síntesis de H_2S cistationina γ -liasa (CSE), DL-propargilglicina (PPG, 1 mM).

Para estudiar la acción de los inhibidores de las PDE4 y 5 en preparaciones de músculo liso del cuello vesical se realizaron CCR de relajación, en muestras precontraídas con FE ($1 \mu\text{M}$), con el inhibidor selectivo de la PDE4 rolipram y de la PDE5, sildenafil y vardenafil, así como, con forskolina, un activador de la adenilato ciclasa (AC) en dosis semilogarítmicas crecientes (0.1 nM – $30 \mu\text{M}$). Debido a que la relajación inducida por el rolipram no era reproducible en dos curvas consecutivas, se realizaron CCR de forma paralela, en segmentos adyacentes del mismo animal, uno como control y el otro incubado con el tratamiento específico.

3.2.4.3. *Medida simultánea de tensión y $[\text{Ca}^{2+}]_i$*

Para la medida simultánea de tensión y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se montaron y normalizaron preparaciones de músculo liso del cuello vesical en un miógrafo simple. Posteriormente, se incubaron las preparaciones con *fura-2 AM* ($8 \mu\text{M}$) y 0.05 % *Cremophor EL*, durante 120 min a 37°C en oscuridad, lavando 3 veces con SSF después

de 60 min reemplazando el fura-2 AM (8 μM) y *Cremophor EL* (0.05%). El miógrafo se colocó sobre la pletina de un microscopio invertido *Zeiss Axiovert S100*, en donde la preparación fue iluminada alternativamente con dos longitudes de onda diferentes, 340 y 380 nm, a una frecuencia de 10 Hz. La selección de estas longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de *fura-2* saturadas de Ca^{2+} (340 nm) y de *fura-2* libre de Ca^{2+} (380 nm). La luz fluorescente emitida por el *fura-2* atraviesa el espejo dicróico y es conducida al fotomultiplicador pasando a través de un filtro interferencial de paso de banda centrado en 510 nm. La fluorescencia de emisión a las dos longitudes de onda (F_{340} y F_{380}) y la fuerza (mN) son registradas simultáneamente mediante el *software Felix* (*Photon Technology International, USA*). Los valores indicados anteriormente (R_{\min} , R_{\max} , $F_{380-\max}$ y $F_{380-\min}$) se determinaron mediante un método que compromete la viabilidad de la preparación y que, por lo tanto, se realiza al final de cada protocolo experimental. Las condiciones de Ca^{2+} mínimas y de saturación se realizaron mediante la incubación de la preparación con el ionóforo ionomicina en una solución con EGTA (K^+ -Hepes 2.0) y con una solución rica en Ca^{2+} (K^+ -Hepes 5), respectivamente. Finalmente, la contribución de la fluorescencia no específica se determinó mediante “*quenching*” del *fura-2* con Mn^{2+} cuyos valores obtenidos fueron sustraídos de todas las medidas obtenidas durante el experimento.

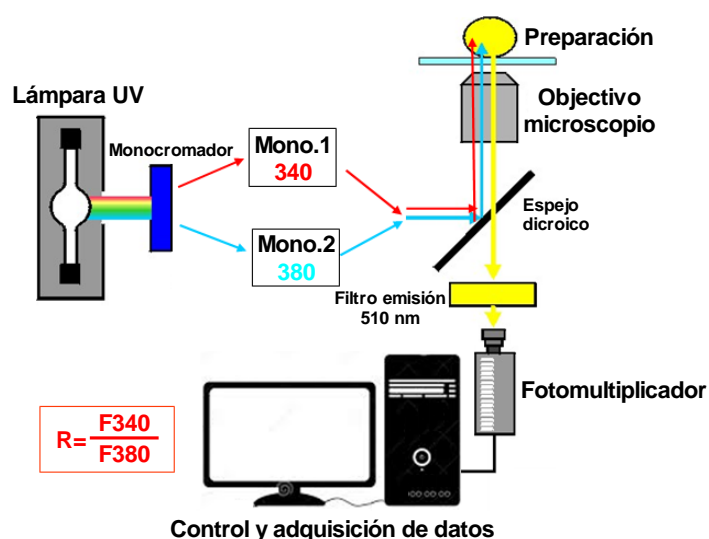


Figura XV. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.

Las preparaciones de músculo liso de cuello vesical fueron inicialmente estimuladas con una SSFK para comprobar su viabilidad funcional, así como, de la entrada de Ca^{2+} al citosol por la activación de canales VOC tipo L mediante la despolarización de la membrana. Posteriormente, se lavaron tres veces con una solución de SSF normal y se dejó estabilizar antes de empezar el protocolo experimental. Las preparaciones fueron precontraídas con FE (1 μM) para obtener un tono sostenido e incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y sobre el cual, se realizaron CCR en concentraciones logarítmicas crecientes de rolipram (1 nM, 100 nM y 10 μM). Finalmente, se añadió SNAP (1 μM), un donante de NO, en aras a obtener un disminución del tono y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles basales.

3.2.4.4. Cálculos y estadística

La contracción inducida por la BK es expresada en porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM). La relajación inducida por la calidina, el rolipram, el sildenafil, el vardenafilo y la EET es expresada en porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por el U46619 (0.1 μM) y la FE (1 μM) en las preparaciones de uréter intravesical y cuello vesical, respectivamente. Para cada CCR, la concentración necesaria para producir el 50 % (EC_{50}) de la respuesta máxima (E_{max}) es obtenida por análisis de regresión no lineal (*GraphPad Prism*, San Diego, CA). La sensibilidad y la máxima respuesta de los agonistas es expresada en valores de pD_2 y E_{max} , respectivamente, donde la pD_2 es definida como el logaritmo negativo de la EC_{50} ($\text{pD}_2 = -\log \text{EC}_{50}$).

Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). La evaluación estadística de las diferencias entre medias se ha realizado utilizando el test de la t de Student para observaciones pareadas. La evaluación de las diferencias significativas entre medias de diversos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de *Bonferroni*. Los valores fueron considerados significativamente diferentes con un nivel de probabilidad por debajo del 5 % ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. ACCIÓN DE LA BK SOBRE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL URÉTER INTRAVESICAL

4.1.1. Expresión de los receptores B₁ y B₂

Estudios de *Western blotting*, usando un anticuerpo específico anti-B₂, en preparaciones pertenecientes al uréter intravesical de cerdo, evidenciaron la presencia de una banda principal de 43 kDa en el músculo liso (M) y en el urotelio (U) (Figura 1A), la cual, corresponde al peso molecular esperado para el receptor B₂. Asimismo, técnicas inmunohistoquímicas con doble marcaje, utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-B₂ y el marcador específico de nervios PGP 9.5, revelaron la expresión del receptor B₂ en el interior de fibras nerviosas distribuidas a lo largo de la capa muscular del uréter intravesical, de forma paralela a los haces de músculo liso (n= 5) (Figura 1B-I).

No se observó expresión de los receptores B₁.

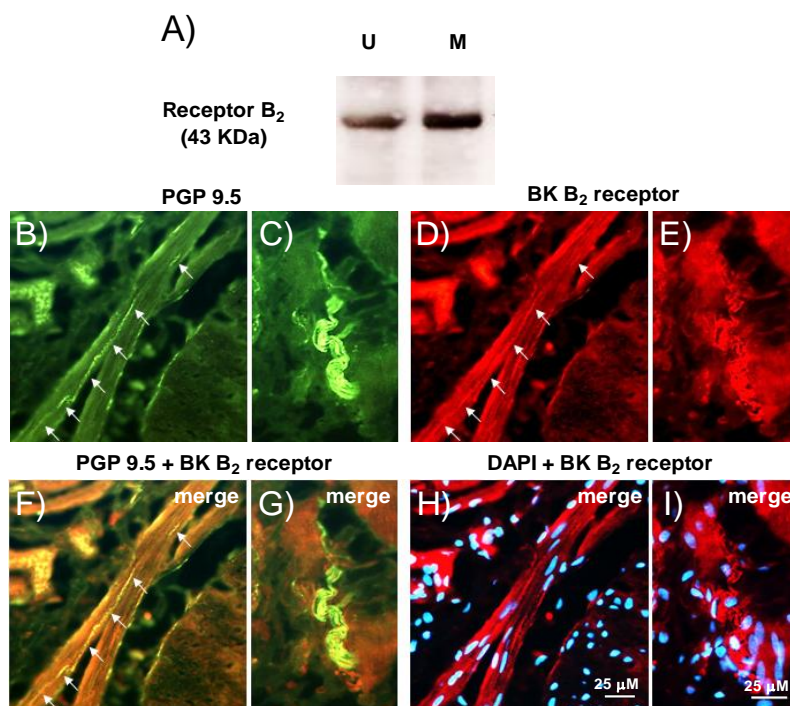


Figura 1. **Expresión de los receptores B₂ en el uréter intravesical del cerdo.** (A) *Western blotting* de membranas pertenecientes al músculo liso (M) y al urotelio (U) del uréter intravesical, incubadas con un anticuerpo anti-receptor B₂, mostrando una banda principal a 43 kDa, correspondiente al peso molecular esperado para el receptor B₂. (B-I) Marcaje inmunohistoquímico que revela la existencia de una rica inervación inmunoreactiva al receptor B₂ (n= 5). (B, D, F y H) muestran el mismo campo en todos casos. (B) Inervación general del uréter intravesical visualizada usando el marcador neruonal PGP 9.5 (color verde). (D) Inmunofluorescencia del receptor B₂ (color rojo), que muestra fibras inmunopositivas para receptor B₂ que discurren en paralelo a los haces de músculo liso. (F) Inmunofluorescencia de doble marcaje para PGP 9.5 y el receptor B₂ revelando la colocalización del receptor B₂ en las terminaciones nerviosas (color amarillo). (H) Visualización de los núcleos celulares utilizando DAPI (color azul). (C, E, G, I). Amplificación de imágenes para B, D, F y H, respectivamente.

4.1.2. Estudios Funcionales

Tiras longitudinales de músculo liso del uréter intravesical fueron normalizadas, durante un período de 60 min, hasta la obtención de una tensión pasiva de 1.9 ± 0.1 g (n= 168 preparaciones de 84 animales). En dichas condiciones, se procedió a evaluar la viabilidad de las muestras mediante su exposición a una SSFK (124 mM), la cual, produjo una contracción de 2.4 ± 0.2 g (n= 168).

4.1.2.1. *Efecto de la eliminación del urotelio y del bloqueo de los receptores B₁ y B₂ y de la COX en la contracción inducida por la BK*

Sobre el tono basal de las preparaciones de uréter intravesical, BK (0.1 nM-30 μ M) produjo una contracción dependiente de la concentración (pD₂ y E_{max}, 6.3 ± 0.2 y 69.3 ± 3 %), la cual, fue inhibida considerablemente en presencia del antagonista selectivo de los receptores B₂, HOE 140 (0.1 μ M), (n=9) (Figura 2A, B) (Tabla 1). Sin embargo dicha respuesta no fue modificada como consecuencia de la eliminación mecánica del urotelio (Tabla 2), o por el pretratamiento con el antagonista de los receptores B₁, R 892 (0.1 μ M) (n=7) (Figura 2C) (Tabla 1) o indometacina (3 μ M), inhibidor de la COX (n=6) (Tabla 2). Asimismo, calidina (0.1 nM-3 μ M), un agonista selectivo de los receptores B₁, no modificó el tensión basal (n=6) o el tono inducido por el análogo del tromboxano U46619 (1 μ M) (n=7).

Estos resultados, en conjunto, sugieren que la BK produce contracción del uréter intravesical vía activación de los receptores B₂, presentes en el músculo liso, a través de un mecanismo independiente de la COX.

Tabla 1. Efecto de los antagonistas de los receptores B₁ y B₂ sobre la contracción inducida por la BK (0.1 nM-30 µM) en preparaciones de músculo liso del uréter intravesical.

BK			
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control R 892 (0.1 µM)	7	7.2±0.1	66.4±6.2
	7	7.1±0.2	70.6±8.5
Control HOE 140 (0.1 µM)	9	6.9±0.3	65.1±6.3
	9	—	25.7±3.1*

Los resultados representan la media ± e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 *versus* control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = -log EC₅₀, donde EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

Tabla 2. Efecto de la eliminación mecánica del urotelio y del inhibidor de la COX en la contracción inducida por la BK (0.1 nM-30 µM).

BK			
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Urotelio intacto Sin urotelio	7	7.0±0.1	75±5.6
	7	7.0±0.2	75±5.2
Control Indometacina (3 µM)	9	6.5±0.3	78.0±11.2
	9	6.5±0.4	82.8±8.8

Los resultados representan la media ± e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 *versus* control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = -log EC₅₀, donde EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

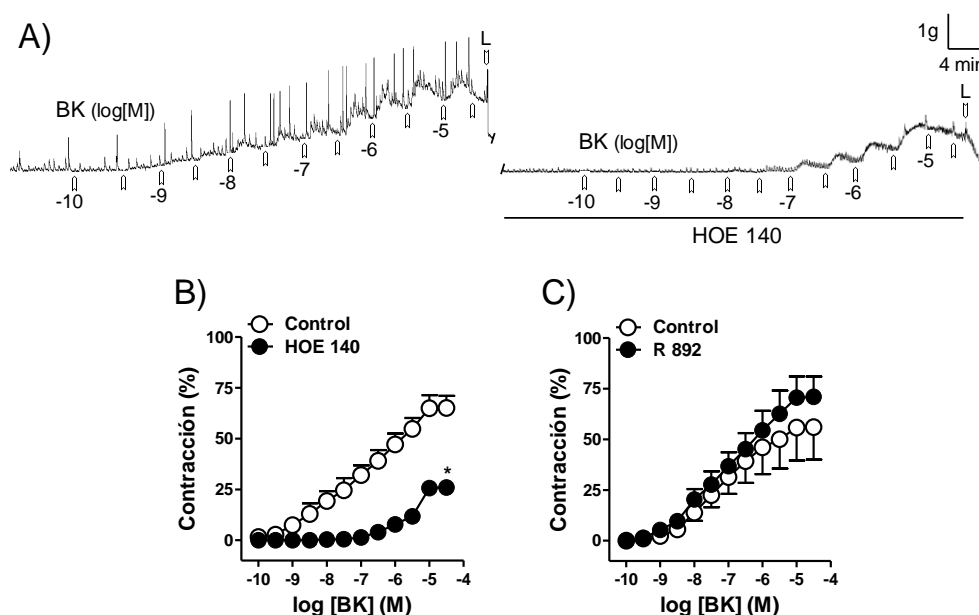


Figura 2. Receptores B_2 median la contracción inducida por la BK en el uréter intravesical. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por BK (0.1 nM-30 μ M) en ausencia y presencia de HOE 140 (0.1 μ M), antagonista selectivo de los receptores B_2 , sobre la tensión basal de preparaciones ureterales. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de contracción dependientes de la concentración de BK en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de HOE 140 (0.1 μ M) (B) y del antagonista selectivo de los receptores B_1 , R 892 (0.1 μ M) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM) y representan la media \pm e.s.m. de 7-8 preparaciones de 4 cerdos. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control, de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

4.1.2.2. *Papel del Ca^{2+} extra e intracelular en la contracción inducida por la BK*

Con objeto de investigar las fuentes de Ca^{2+} , extra e intracelular, involucradas en la contracción bradicinérgica, se procedió a la exposición de las preparaciones a una SSF libre de Ca^{2+} (SSF^0). La eliminación del Ca^{2+} del medio extracelular abolió la respuesta de BK (la contracción inducida por BK (3 μM) fue de 61 ± 9 % y 3 ± 1 %* del tono inducido por una SSFK, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, respectivamente, * $P < 0.05$, test de la t de Student para observaciones pareadas, $n = 7$) (Figura 3A-B).

La nifedipina (1 μM , $n = 6$) y el SKF 96365 (10 μM , $n = 6$), bloqueantes de los canales VOC tipo L y de otros tipos canales de Ca^{2+} , respectivamente, redujeron drásticamente la contracción inducida por la BK (Figura 3D). La incubación conjunta de la nifedipina y el SKF 96365 produjo una inhibición similar a la observada con los tratamientos individuales ($n = 8$) (Figura 3C-D).

Estos resultados sugieren que la contracción inducida por la BK es producida esencialmente a través del influjo Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo L. El Y27632 (10 μM), un inhibidor selectivo de la vía Rho/Rho cinasa, no modificó la contracción inducida por la BK ($n = 6$).

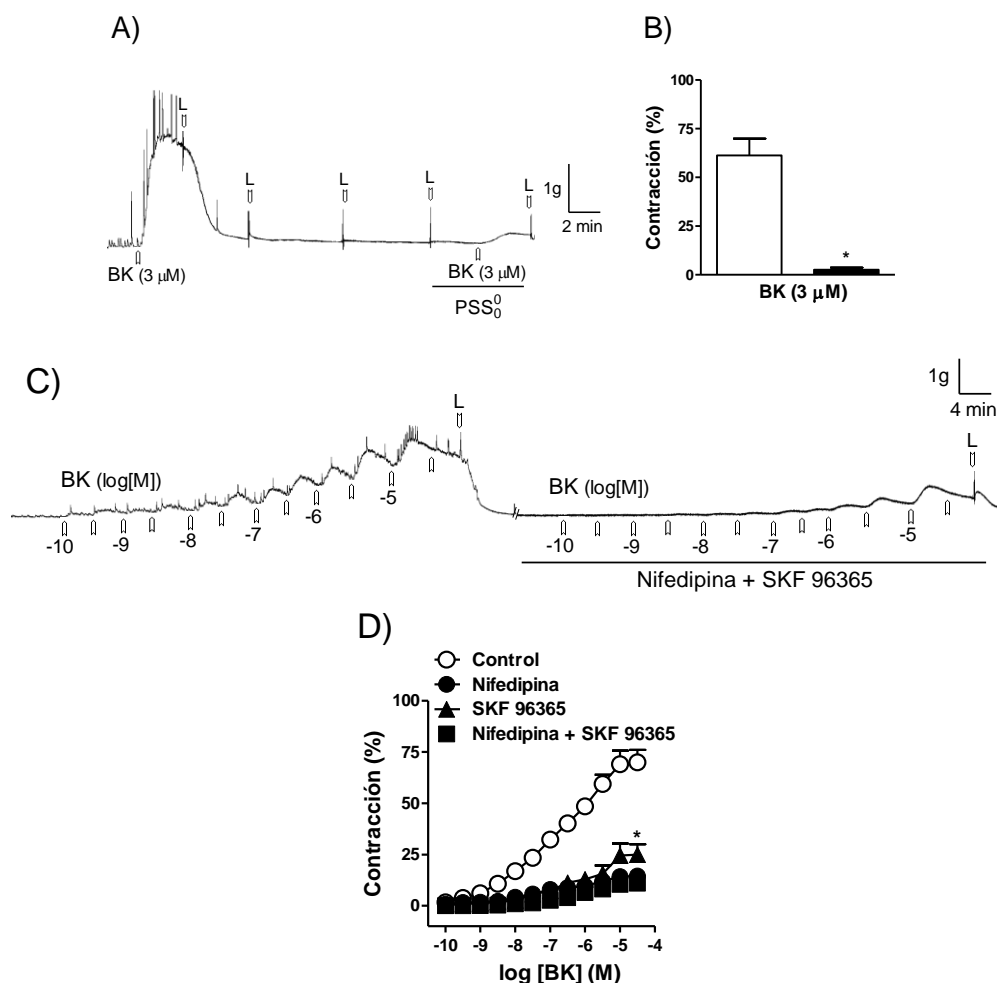


Figura 3. La contracción inducida por BK es debida principalmente a la entrada del Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por la bradicinina (BK, 3 μM) en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, sobre la tensión basal de las preparaciones de uréter intravesical. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo, en minutos (min). (B) Histograma que muestra la contracción producida por la BK (3 μM) en una SFF normal (barra vacía) y en una SFF libre de Ca^{2+} (SFF_0) (barra llena). (C) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por BK (0.1 nM-30 μM), en ausencia y presencia de nifedipina (1 μM) y SKF 96365 (10 μM) sobre la tensión basal de preparaciones de uréter intravesical. (D) Curvas de contracción dependientes de la concentración de BK en ausencia (círculos vacíos) y presencia (símbolos llenos) de los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} nifedipina (1 μM) (círculos llenos), SKF 96365 (10 μM) (triángulos llenos) y la nifedipina junto con el SKF 96365 (cuadrados llenos). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM), y representan la media \pm e.s.m. de 6-8 preparaciones de 3-4 cerdos. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de *Bonferroni*.

4.1.2.3. Modulación de los receptores de la BK en la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente e independiente del NO en el uréter intravesical

Para el estudio de la posible implicación de los receptores de BK sobre la neurotransmisión inhibitoria NANC, las preparaciones fueron incubadas con guanetidina (10 μ M) y atropina (0.1 μ M), bloqueantes de la neurotransmisión noradrenérgica y de los receptores muscarínicos, respectivamente, y precontraídas con el análogo del tromboxano U46619 (0.1 μ M). En dichas condiciones, la EET (0.5-16 Hz) produjo una relajación dependiente de la frecuencia, la cual, fue reducida por el antagonista de los receptores B₂, HOE 140 (0.1 μ M, n= 8) en ausencia (Figura 4A-B) y presencia (Figura 4C) de L-NOARG (100 μ M), inhibidor de la sintasa de NO. Sin embargo, R 892 (0.1 μ M, n=6), antagonista de los receptores B₁, no modificó dicha relajación (Figura 4D). Asimismo, en preparaciones incubadas con L-NOARG (100 μ M), inhibidor de la sintasa de NO, el HOE140 redujo la relajación producida por la EET (Figura 4C). Estos resultados sugieren que los receptores B₂ están involucrados en la modulación de la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica e independiente de NO en el uréter intravesical.

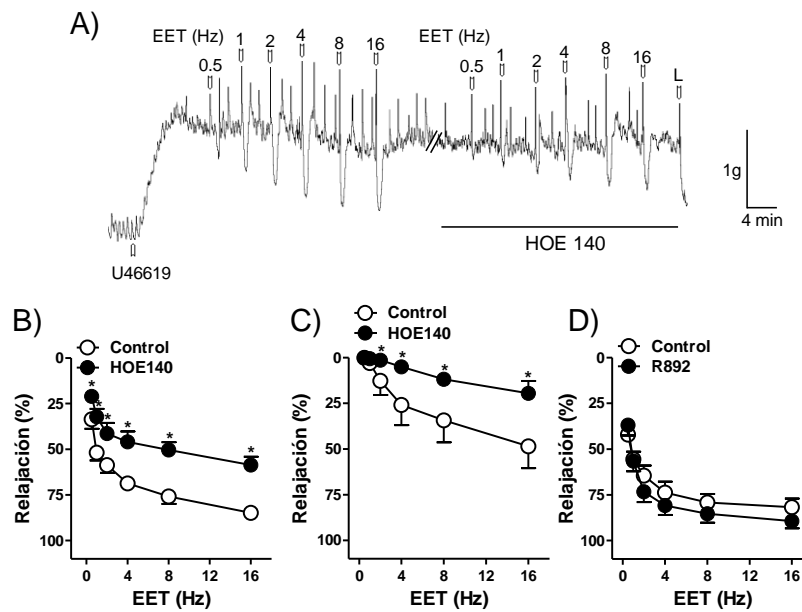


Figura 4. **Receptores B_2 neuronales estimulan la neurotransmisión inhibitoria NANC del uréter intravesical.** (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 0.5-16 Hz, trenes de 20 s) en ausencia y presencia del antagonista de los receptores B_2 , HOE 140 (0.1 μ M), en preparaciones de cuello vesical precontraídas con U46619 (0.1 μ M) y tratadas con guanetidina (10 μ M) y atropina (0.1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de relajación dependientes de la frecuencia de EET en condiciones control (círculos vacíos) y en presencia (círculos llenos) de HOE 140 (0.1 μ M), en ausencia (B) y presencia (C) del inhibidor de la sintasa de NO, L-NOARG (100 μ M) y del antagonista de los receptores B_1 , R 892 (0.1 μ M) (D). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por el U46619 y representan la media \pm e.s.m. de 6-8 preparaciones de 4 animales. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control, de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

4.2. ACCIÓN DE LA BK SOBRE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL CUELLO VESICAL

4.2.1. Expresión de los receptores B₁ y B₂

La expresión de los receptores de la BK fue estudiada mediante *Western blotting* e inmunohistoquímica de doble marcaje en el cuello de la vejiga del cerdo. Los estudios de *Western blotting*, utilizando anticuerpos anti-B₁ y anti-B₂ mostraron bandas principales de 35 kDa, las cuales corresponden al peso molecular esperado para dichos receptores, en el urotelio y en el músculo liso, respectivamente (Figura 5A). Asimismo, la incubación conjunta de anticuerpos selectivos de los receptores B₁ y B₂ con el marcador neuronal PGP 9.5 reveló la expresión del receptor B₂ en fibras nerviosas ampliamente distribuidas en el músculo liso del cuello vesical, discurriendo paralelamente a los haces musculares (Figura 5F-I). Únicamente, se observó inmunorreactividad del receptor B₁ en el urotelio (Figura 5B-E).

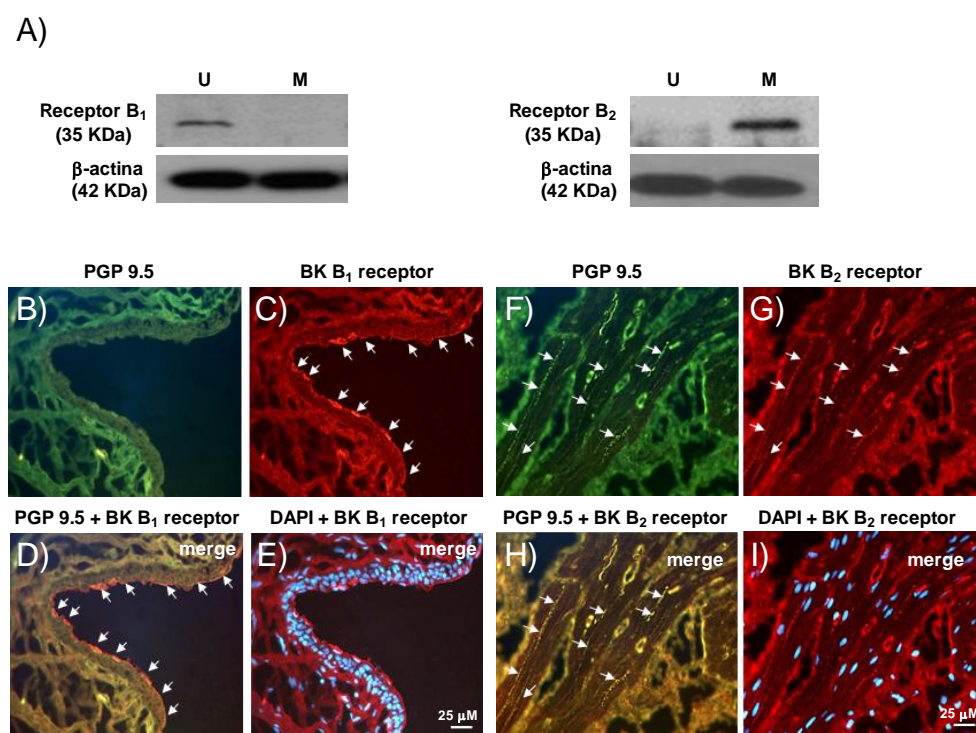


Figura 5. Expresión de los receptores B₁ y B₂ en el cuello de la vejiga del cerdo. (A) *Western blotting* de membranas de urotelio (U) y músculo liso (M) del cuello vesical incubadas con anticuerpos anti-receptor B₁ y anti-receptor B₂, mostrando una banda principal a 35 kDa, correspondiente al peso molecular esperado para dichos receptores, en el urotelio y en el músculo liso, respectivamente. (B-I) Marcaje inmunohistoquímico mostrando la expresión de los receptores B₁ y B₂ (n= 5). (B, F) Intervención general del cuello de la vejiga utilizando el marcador neuronal PGP 9.5 (color verde). (C, G) Inmunofluorescencia de los receptores B₁ y B₂ (color rojo), (C) fibras inmunopositivas para receptores B₁ en el urotelio y (G) para receptores B₂ en la capa muscular. (D, H) Inmunofluorescencia doble mediante la incubación conjunta de PGP 9.5 y anticuerpos de los receptores B₁ y B₂ (color amarillo), (H) demostrando únicamente la presencia del receptor B₂ en las terminaciones nerviosas. (E, I) Visualización de los núcleos celulares utilizando DAPI (color azul).

4.2.2. Estudios Funcionales

Tiras desprovistas de urotelio pertenecientes al músculo liso del cuello de la vejiga urinaria del cerdo fueron normalizadas durante un período de 60 min hasta obtener una tensión pasiva 2.1 ± 0.1 g (n= 168 preparaciones de 84 animales, utilizando 1-2 preparaciones de cada animal). En dichas condiciones, SSFK (124 mM) produjo una contracción de 2.4 ± 0.2 g (n= 168).

4.2.2.1. Efecto de la eliminación del urotelio y del bloqueo de los receptores B₁ y B₂ y de la COX en la contracción inducida por la BK

Sobre el tono basal de preparaciones del cuello vesical desprovistas de urotelio, la BK (0.1 nM-30 μ M) produjo una contracción dependiente de la concentración (Figura 6A,B). Dicha respuesta era menor en muestras con urotelio intacto, razón por la cual, el estudio funcional referido a la contracción inducida por BK fue llevado a cabo en tiras desprovistas de urotelio. La contracción inducida por la BK fue drásticamente reducida en presencia del antagonista selectivo de los receptores B₂, HOE 140 (0.1 μ M) (Figura 6D) e incrementada por la indometacina (3 μ M) (Figura 6E), un inhibidor no selectivo de la COX. Dicha respuesta, sin embargo, no fue modificada como consecuencia de la incubación con el antagonista de los receptores B₁, R 892 (0.1 μ M) (Figura 6C). Asimismo, la calidina (0.1 nM-3 μ M), un agonista selectivo de dichos receptores, no incrementó la tensión basal de las preparaciones.

Estos resultados, en conjunto, sugieren que la BK produce contracción del cuello vesical vía activación de los receptores B₂ localizados en el músculo liso, siendo dicho efecto modulado por prostanoides derivados de la COX.

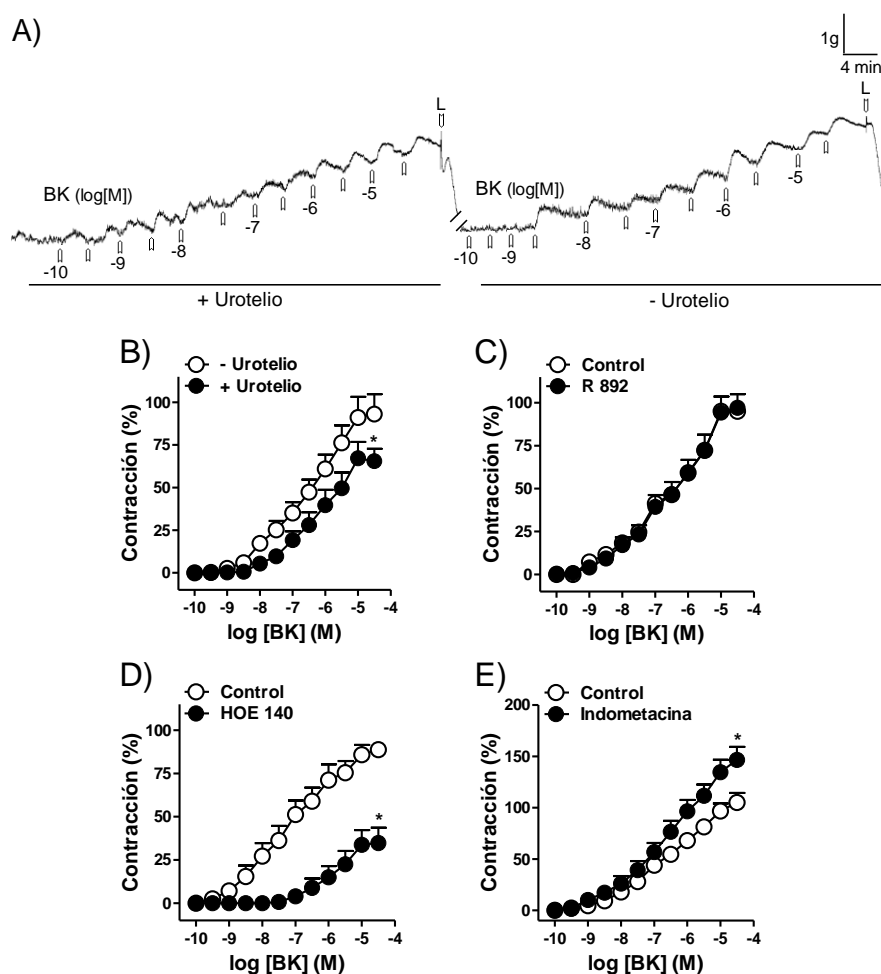


Figura 6. Los receptores B_2 musculares están involucrados en la contracción de la BK. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por la BK (0.1 nM-30 μ M) sobre la tensión basal de las preparaciones del cuello vesical en presencia (+) y ausencia (-) del urotelio. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo, en minutos (min). (B-E) Curvas de contracción dependientes de la concentración de la BK en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de urotelio (B), y de R 892 (0.1 μ M) (C), HOE 140 (0.1 μ M) (D) e indometacina (3 μ M) (E), antagonistas selectivos de los receptores B_1 y B_2 e inhibidor de la COX, respectivamente. Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM) y representan la media \pm e.s.m. de 6-9 preparaciones de 4-5 cerdos. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

4.2.2.2. *Papel del Ca^{2+} extra e intracelular en la contracción inducida por la BK*

Para investigar las fuentes de Ca^{2+} , extracelular y/o movilizado desde los depósitos intracelulares, en la contracción bradicinérgica, se procedió a la exposición de las preparaciones del cuello vesical a una SSF_0 . La eliminación del Ca^{2+} del medio extracelular redujo considerablemente la respuesta de la BK (la contracción inducida por la BK (3 μM) fue de 73.9 ± 9 % y 11.2 ± 6 %* del tono inducido por una SSFK, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, respectivamente, * $P < 0.05$, test de la t de Student para observaciones pareadas, $n = 7$ (Figura 7A,B).

La nifedipina (1 μM) y el SKF 96365 (10 μM), redujeron drásticamente la contracción inducida por la BK (Figura 7D), mientras que el pretratamiento conjunto de ambos bloqueantes produjo una inhibición similar a la producida únicamente por la nifedipina (Figura 7C,D). El Y 27632 (10 μM), un inhibidor de la vía Rho/Rho cinasa, no modificó la respuesta de BK.

Estos resultados sugieren que la contracción inducida por la BK es producida esencialmente a través del influjo Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo L.

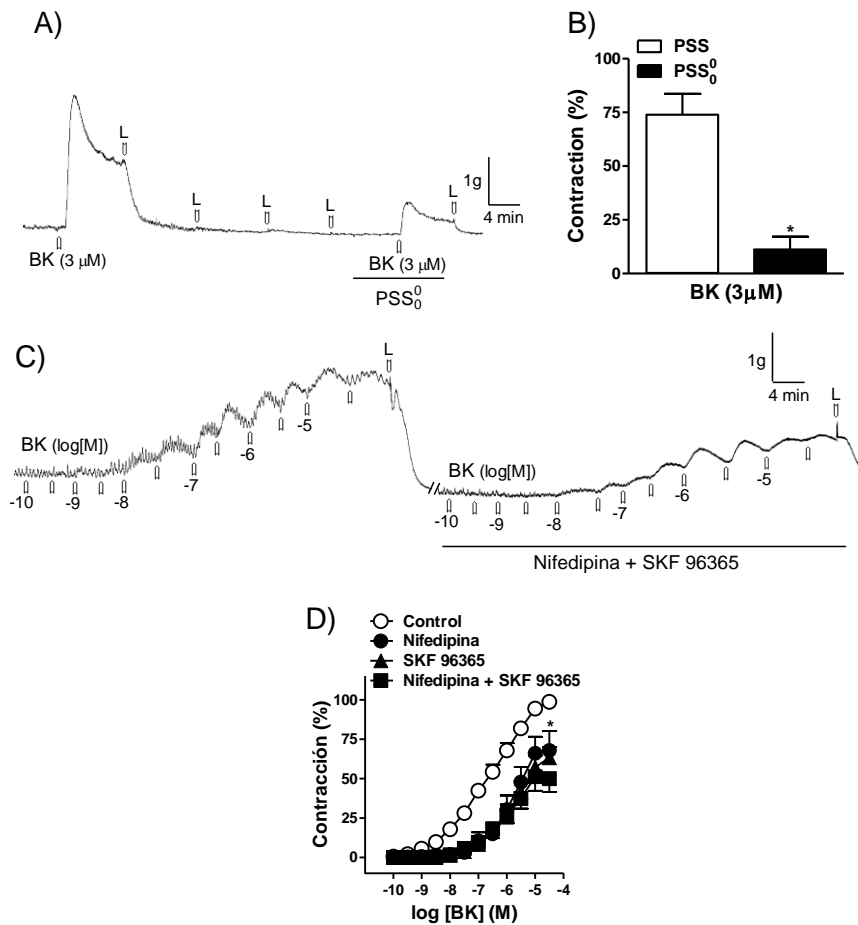


Figura 7. La contracción inducida por la BK en el cuello vesical es esencialmente dependiente de la entrada del Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por la bradicinina (BK, $3 \mu\text{M}$) en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, sobre la tensión basal de las preparaciones de uréter intravesical. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo, en minutos (min). (B) Histograma que muestra la contracción producida por la BK ($3 \mu\text{M}$) en una SSF normal (barra vacía) y en una SSF libre de Ca^{2+} (SSF 0) (barra llena). (C) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por la BK (0.1 nM - $30 \mu\text{M}$), en ausencia y presencia de la nifedipina ($1 \mu\text{M}$) y el SKF 96365 ($10 \mu\text{M}$) sobre la tensión basal de preparaciones del cuello vesical. (D) Curvas de contracción dependientes de la concentración de la BK en ausencia (círculos vacíos) y presencia (símbolos llenos) de los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} nifedipina ($1 \mu\text{M}$) (círculos llenos), SKF 96365 ($10 \mu\text{M}$) (triángulos llenos) y nifedipina junto con SKF 96365 (cuadrados llenos). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSF (124 mM), y representan la media \pm e.s.m. de 6-8 preparaciones de 3-4 cerdos. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Bonferroni.

4.2.2.3. Efecto de la eliminación del urotelio y del bloqueo de los receptores B_1 , de la sintasa de NO, de la COX-1 y de los canales de K^+ en la relajación inducida por la calidina

Con objeto de investigar una posible relajación mediada a través de receptores uroteliales B_1 , preparaciones con urotelio intacto fueron precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M), donde la calidina (0.1 nM-3 μ M), un agonista selectivo de receptores B_1 , indujo una relajación dependiente de la concentración (Figura 8A), la cual, no fue modificada en presencia de L-NOARG, inhibidor de la sintasa del NO (100 μ M) (Figura 8D). Dicha respuesta, sin embargo, era reducida en presencia de la indometacina (3 μ M) (Figura 8E), el SC 560 (1 μ M) (Figura 8F) y la iberiotoxina (IbTX, 100 nM) (Figura 8H), inhibidor no selectivo de la COX y bloqueante selectivo de la COX-1 y de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK_{Ca}), respectivamente, y abolida como consecuencia de la eliminación mecánica del urotelio (Figura 8B), en presencia del antagonista del receptor B_1 , R 892 (0.1 μ M) (Figura 8C), y muestras precontraídas con una SSFK (80 mM) (Figura 8G) (Tabla 3). Estos resultados sugieren que los receptores B_1 , presentes en el urotelio, median la relajación bradikinérgica del cuello vesical a través un mecanismo dependiente de la vía de la COX-1 involucrando la activación de los canales BK_{Ca} .

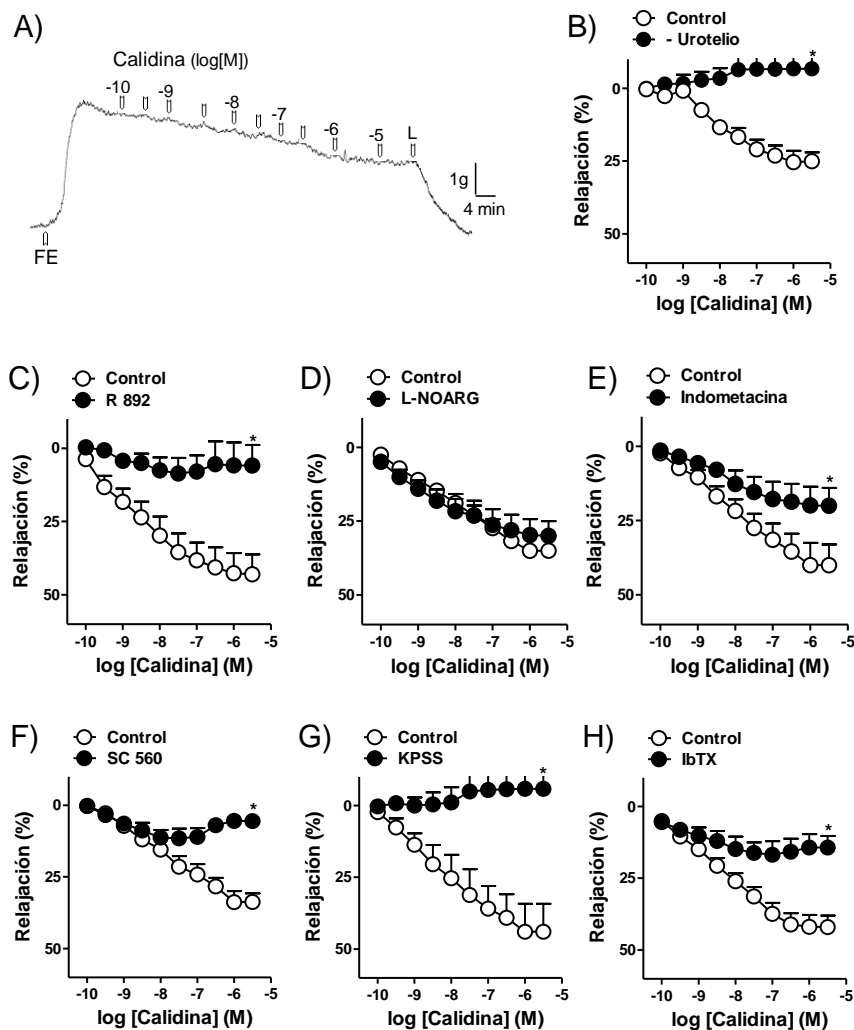


Figura 8. Los receptores B_1 uroteliales están involucrados en la relajación bradicinérgica del cuello vesical. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el agonista de los receptores B_1 , la calidina (0.1 nM-3 μ M), en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B) Curvas de relajación dependiente de la concentración de calidina en preparaciones con urotelio intacto (círculos vacíos) y desprovistas de urotelio (círculos llenos). (C-H) Curvas de relajación dependientes de la concentración de la calidina en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de R 892 (0.1 μ M) (C), L-NOARG (100 μ M) (D), indometacina (3 μ M) (E) y SC 560 (1 μ M) (F), bloqueantes del receptor B_1 , de la sintasa del NO, de la COX y la COX-1, respectivamente, y sobre el tono inducido por una SSFK (80 mM) (G) y en presencia del bloqueante de los canales BK_{Ca} , iberiotoxina (IbTX, 100nM) (H). Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 6-9 preparaciones de 4-5 cerdos. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control, de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

Tabla 3. Efecto de la eliminación mecánica del urotelio y del bloqueo del receptor B₁, de la sintasa del NO, de la vía de la COX-1 y de los canales BK_{Ca} en la relajación inducida por el agonista del receptor B₁, calidina (0.1 nM-3 µM) en preparaciones con urotelio intacto precontraídas con la FE (1 µM).

	Calidina		
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Urotelio intacto	7	7.9±0.1	25±3
Sin urotelio	7	_____	0±0*
Control	6	8.3±0.1	43±7
R 892 (0.1 µM)	6	_____	6±6*
Control	6	7.9±0.1	35±2
L-NOARG (100 µM)	6	_____	30±5
Control	9	8.0±0.1	40±7
Indometacina (3 µM)	9	_____	20±6*
Control	6	7.7±0.1	34±3
SC 560 (1 µM)	6	_____	5±2*
Control	6	8.3±0.1	42±4
IbTX (100 nM)	6	_____	14±4*

Los resultados representan la media±e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la relajación máxima, expresada como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE (1 µM). *pD*₂=-log *EC*₅₀, donde la *EC*₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % del *E*_{max}.

4.2.2.4. *Modulación ejercida por los receptores de la BK sobre la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical*

Para el estudio de la posible modulación de los receptores de la BK sobre la neurotransmisión inhibitoria NANC, las preparaciones fueron incubadas con guanetidina (10 μ M) y atropina (0.1 μ M), bloqueantes de la neurotransmisión noradrenérgica y de los receptores muscarínicos, respectivamente, y precontraídas con FE (1 μ M). En dichas condiciones, la EET (0.5-16 Hz) produjo una relajación dependiente de la frecuencia, la cual, fue reducida por el antagonista de los receptores B₂, HOE 140 (0.1 μ M) en ausencia (Figuras 9A,C) y presencia (Figura 9D) del bloqueante de la sintasa de NO, L-NOARG (100 μ M). Sin embargo, el bloqueo de los receptores B₁ con R 892 (0.1 μ M) no modificó dicha respuesta (Figuras 9B) (Tabla 4).

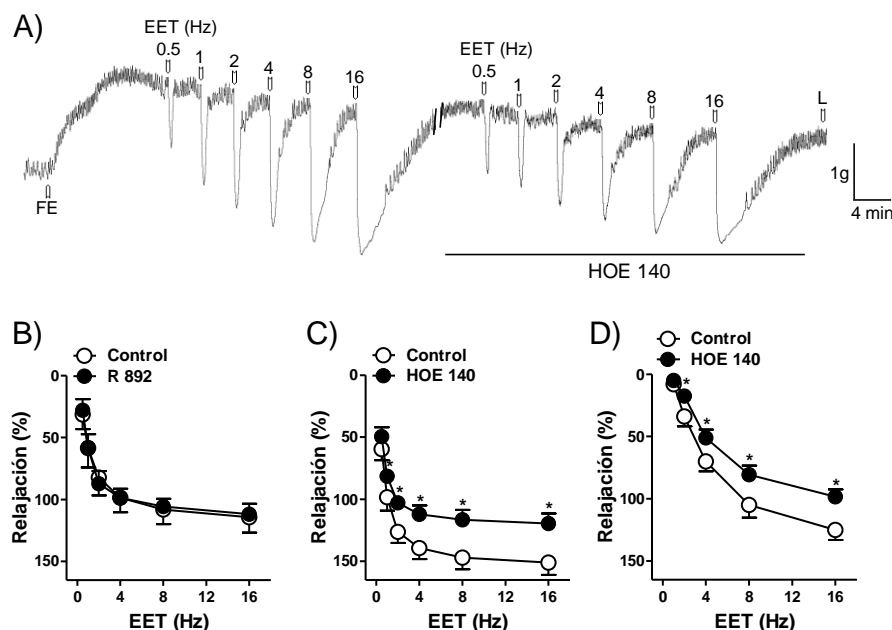


Figura 9. Los receptores B_2 neuronales están involucrados en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 0.5-16 Hz, trenes de 20 s) en ausencia y presencia del antagonista de los receptores B_2 , HOE 140 (0.1 μM), en preparaciones de cuello vesical precontraídas con la FE (1 μM) y tratadas con la guanetidina (10 μM) y la atropina (0.1 μM). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de relajación dependientes de la frecuencia de la EET en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de R 892 (0.1 μM) (C) y de HOE 140 (0.1 μM) (D) y con la guanetidina (10 μM), la atropina (0.1 μM) y la L-NOARG (100 μM) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media ± e.s.m. de 6-7 preparaciones de 3-4 animales. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

Tabla 4. Efecto del bloqueo de los receptores B₁ y B₂ en la relajación inducida por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, rango de frecuencias entre 0,5-16 Hz, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en preparaciones de cuello de vejiga urinaria del cerdo tratadas con la guanetidina (10 µM) y la atropina (0.1 µM), para bloquear la neurotransmisión noradrenérgica y los receptores muscarínicos, respectivamente, y precontraídas con fenilefrina (FE, 1 µM), en presencia y ausencia del inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, L-NOARG (100 µM).

		EET (Hz)						
		<i>n</i>	0,5	1	2	4	8	16
Control		6	31±11	58±12	82±14	98±12	108±11	114±3
	R 892 (0.1 µM)	6	28±9	58±15	87±10	99±7	106±6	112±8
Control		7	59±9	98±11	126±9	139±9	147±9	151±10
	HOE 140 (0.1 µM)	7	50±7	81±5*	102±4*	112±7*	117±8*	120±8*
		En presencia de L-NOARG						
Control		6	0±0	8±3	34±8	70±8	105±10	125±8
	HOE 140 (0.1 µM)	6	0±0	5±3	18±4*	51±7*	81±7*	98±6*

Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 µM), y representan la media±e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas).

4.3. RELAJACIÓN INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DE LA FOSFODIESTERASA 4 (PDE4) ROLIPRAM EN EL CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA

4.3.1. Expresión de la PDE4 en el cuello vesical

La expresión de la PDE4 fue investigada mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo selectivo de dicha enzima NPP4. Dichos estudios revelaron una rica inmunorreactividad a NPP4 en la capa de músculo liso del cuello de la vejiga de cerdo y del hombre, así como en el interior de fibras nerviosas que discurren paralelamente a los haces musculares (n=5) (Figura 10).

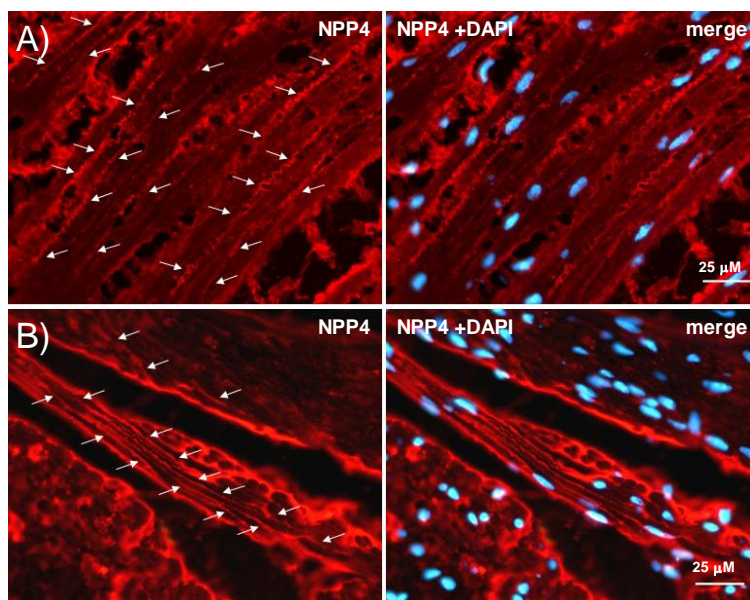


Figura 10. **Expresión de la PDE4 en el cuello de la vejiga.** (A-B) Marcaje inmunohistoquímico del cuello de la vejiga de cerdo (A) y del hombre (B), mostrando una abundante expresión de la PDE4 (n= 3-5). Fibras inmunopositivas para la PDE4 (NPP4) que discurren en paralelo a las capas musculares lisas (flechas) Visualización de los núcleos celulares utilizando DAPI (color azul).

4.3.2. Estudios Funcionales

Tiras desprovistas de urotelio pertenecientes al cuello de la vejiga urinaria del cerdo y del hombre fueron normalizadas durante un período de 60 minutos hasta la consecución de una tensión pasiva de 2.1 ± 0.1 g (n= 123 preparaciones de 71 cerdos) y 2.0 ± 0.1 g (n= 14 preparaciones de 3 donantes de órganos), respectivamente. En dichas condiciones, la SSFK (124 mM) produjo una contracción de 2.4 ± 0.2 g (n= 168). Las preparaciones fueron precontraídas con FE (1 μ M), la cual, indujo un tono sostenido de 2.3 ± 0.1 g (n= 116) en el cerdo y de 2.2 ± 0.1 g (n= 14) en las muestras humanas.

4.3.2.1. *Relajación inducida por el rolipram y por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafilo en el cuello de la vejiga del cerdo*

El inhibidor de la PDE4 rolipram (0.1 nM-10 μ M) (n= 9) (Figura 11A,D), el sildenafil (0.1 nM-30 μ M) (Figura 11B,D) y el vardenafilo (0.1 nM-30 μ M), inhibidores de la PDE5, (n= 7) (Figura 11C,D) produjeron una relajación dependiente de la concentración del músculo liso del cuello vesical del cerdo con la siguiente potencia: rolipram>>sildenafil>vardeafilo.

Estos resultados claramente indican una mayor relajación de rolipram con respecto a la originada por los inhibidores de la PDE5.

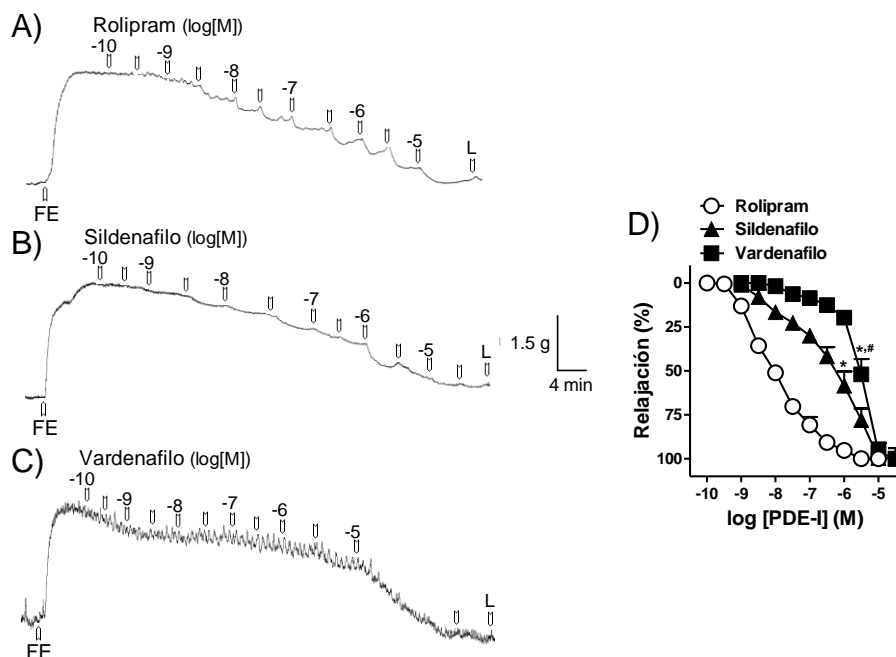


Figura 11. **Relajación inducida por los inhibidores de las PDE 4 y 5 en el cuello de la vejiga del cerdo.** (A-C) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el inhibidor de la PDE4, rolipram (0.1 nM-10 μ M) (A), y por los inhibidores de la PDE5, sildenafil (0.1 nM- 30 μ M) (B) y vardenafil (0.1 nM-30 μ M) (C) en preparaciones del cuello vesical desprovistas de urotelio y precontraídas con la fenilefrina (FE, 1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B) Curvas de relajación dependientes de la concentración de rolipram (círculos vacíos), sildenafil (triángulos llenos) y vardenafil (cuadrados llenos). Los resultados representan la media \pm e.s.m. de 7-9 preparaciones de 4-5 cerdos. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto al valor de rolipram y sildenafil, respectivamente, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de *Bonferroni*.

4.3.2.2. Efecto de la presencia del urotelio y del bloqueo de la guanilato ciclasa soluble y de la vía de la COX en la relajación inducida por el rolipram

En las preparaciones con el urotelio intacto o desprovistas de urotelio y precontraídas con FE (1 μ M), el rolipram (0.1 nM-10 μ M) produjo una relajación dependiente de la concentración de magnitud similar en presencia y ausencia de urotelio. Dicha respuesta no fue modificada por el ODQ (5 μ M) y la indometacina (3 μ M) (n=6), bloqueantes de la guanilato ciclasa soluble y de la vía de la COX, respectivamente (Tabla 5). Dichos resultados indican que el efecto de rolipram se produce a través de mecanismos independientes de la guanilato ciclasa y de la COX.

Tabla 5. Efecto de la eliminación mecánica del urotelio y del bloqueo de la guanilato ciclasa soluble y de las COX en la relajación inducida por el inhibidor selectivo de la PDE4, rolipram (0.1 nM-10 μ M).

	Rolipram		
	<i>n</i>	<i>pD₂</i>	<i>E_{max}</i> (%)
Urotelio intacto	7	8.2±0.3	100±0.0
Sin urotelio	7	8.1±0.3	100±0.0
Control	6	8.0±0.1	99.9±3.3
ODQ (5 μ M)	6	8.2±0.1	98.8±2.5
Control	6	8.1±0.2	100±2.7
Indometacina (3 μ M)	6	8.3±0.2	100±4.7

Los resultados representan la media±e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E_{max}* es la relajación máxima, expresada como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por la fenilefrina (1 μ M). *pD₂*=-log EC₅₀, donde la EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % del *E_{max}*.

4.3.2.3. Efecto de la activación de la adenilato ciclasa y del bloqueo de la PKA en la relajación inducida por el rolipram

El activador de la adenilato ciclasa, la forskolina (0.1 nM-3 μ M) indujo una relajación dependiente de la concentración del cuello de la vejiga del cerdo (pD₂ y Emax de 6.5 \pm 0.1 y 100 \pm 0 %, n=7) (Figura 12). Una concentración umbral de forskolina (30 nM) potenció la relajación inducida por el rolipram (n= 6), mientras que el inhibidor selectivo de la PKA, KT5720 (3 μ M), redujo dicha respuesta (n=6) (Figura 12) (Tabla 6). Estos resultados sugieren que la relajación inducida por el rolipram es producida a través de la activación de la PKA.

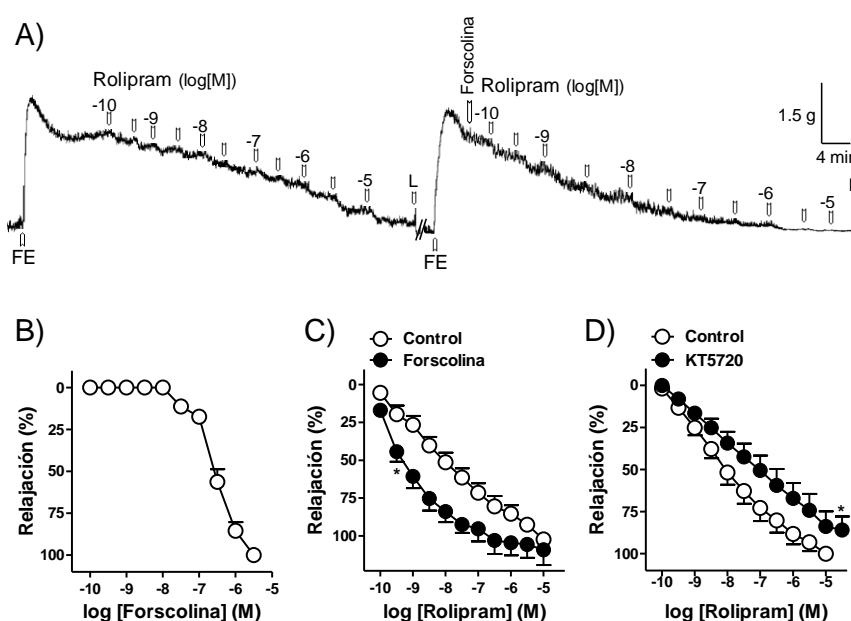


Figura 12. Implicación de la PKA en la relajación del cuello vesical inducida por el rolipram.

(A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el rolipram (0.1 nM-10 μ M) en presencia y ausencia de una concentración umbral del activador de la adenilato ciclasa soluble, forskolina (30nM) en preparaciones del cuello vesical desprovistas de urotelio precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B) Curva de relajación dependiente de la concentración de forskolina (círculos vacíos). (C-D) Curvas de relajación dependientes de la concentración de rolipram en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de forskolina (30 nM) (C), y del inhibidor selectivo de la adenilato ciclasa soluble, KT5720 (3 μ M) (D). Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 6-7 preparaciones de 3-4 cerdos. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto al valor control, de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

Tabla 6. Efecto de la activación de la adenilato ciclasa y del bloqueo de la PKA en la relajación inducida por el rolipram (0.1 nM-10 μ M) en preparaciones desprovistas de urotelio y precontraídas con la fenilefrina (FE, 1 μ M).

Rolipram			
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	7	7.7 \pm 0.4	100 \pm 2.3
Forscolina (30 nM)	7	8.6 \pm 0.2*	127 \pm 10.1
Control	6	8.7 \pm 0.3	98.3 \pm 1.6
KT5720 (3 μ M)	6	7.0 \pm 0.4*	85.9 \pm 8.9

Los resultados representan la media \pm e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la relajación máxima, expresada como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M). *pD*₂=-log *EC*₅₀, donde la *EC*₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % del *E*_{max}.

4.3.2.4. Efecto del bloqueo de los canales de K⁺ en la relajación inducida por el rolipram

La estimulación de las preparaciones con una SSFK (80 mM) produjo un tono sostenido de 1.9 \pm 0.2 g. Sobre dicha contracción, rolipram indujo una relajación dependiente de la concentración inferior a la obtenida en muestras precontraídas con FE (1 μ M) (Figura 13A,B).

La IbTX (100 nM) (n=7) (Figura 13C) y el TRAM 34 (20 nM) (n=6) (Figura 13D), bloqueante de los canales BK_{Ca} e IK_{Ca}, respectivamente, redujeron la relajación inducida por el rolipram en el cuello vesical del cerdo. En presencia de la glibenclamida (1 μ M) y de la apamina (0,5 μ M), bloqueantes de los canales K_{ATP} y SK_{Ca}, respectivamente, no modificaron dichas respuestas, mientras que la 4-AP (1 μ M), inhibidor de los canales Kv, potenció dicha respuesta relajante (Tabla 7). Estos resultados sugieren que la relajación de rolipram es producida vía activación de los canales BK_{Ca} e IK_{Ca}.

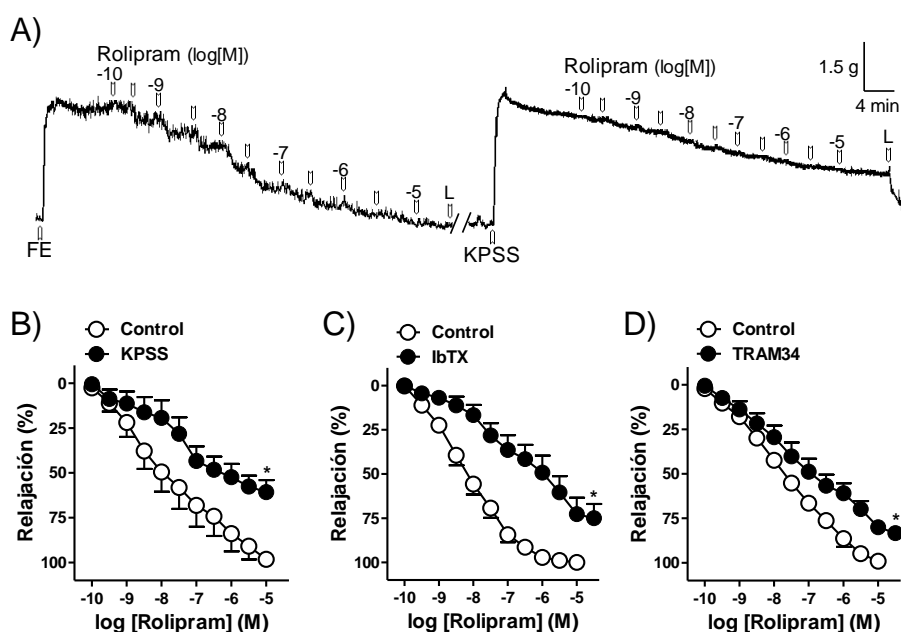


Figura 13. Implicación de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} en la relajación del cuello vesical inducida por el rolipram. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el inhibidor de la PDE4, rolipram (0.1nM-10µM) en preparaciones del cuello vesical desprovistas de urotelio precontraídas con fenilefrina (FE, 1 µM) y con una SSFK (80 mM). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B) Curva de relajación dependiente de la concentración de Rolipram en preparaciones desprovistas de urotelio y precontraídas con fenilefrina (FE, 1 µM) (círculos vacíos) y con una SSFK (80 mM) (círculos llenos). (C-D) Curvas de relajación dependientes de la concentración de rolipram en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de la IbTX (100 nM) y del TRAM34 (20 nM) bloqueantes selectivos de los canales de los BK_{Ca} (C) IK_{Ca} (D), respectivamente. Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media±e.s.m. de 6-7 preparaciones de 3-4 cerdos. * $P<0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto al valor control de acuerdo al test de la t de Student para observaciones pareadas.

Tabla 7. Efecto del bloqueo de los canales de K⁺ en la relajación inducida por el rolipram (0.1 nM-10 μ M) en preparaciones desprovistas de urotelio y precontraídas con la fenilefrina (FE, 1 μ M).

Rolipram			
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	6	7.6±0.7	98.5±1.5
KPSS (80 mM)	6	_____	61.7±5.5*
Control	6	8.1±0.2	99.0±1.0
IbTX (100 nM)	6	_____	72.7±10.3*
Control	7	7.4±0.3	99.1±0.9
TRAM34 (20 nM)	7	_____	82.1±2.7*
Control	6	7.4±0.4	98.5±6.0
Apamina (0.5 μ M)	6	7.2±0.7	92.8±4.9
Control	7	6.2±0.8	98.8±3.9
Glibenclamida (1 μ M)	7	6.1±0.7	92.4±4.3
Control	6	7.3±0.3	99.0±1.04
4-AP (1 mM)	6	8.4±0.2*	100±0.0

Los resultados representan la media±e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la relajación máxima, expresada como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M). *pD*₂=-log *EC*₅₀, donde la *EC*₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % del *E*_{max}.

4.3.2.5. Efecto del bloqueo de los canales de Ca²⁺ neuronales dependientes de voltaje y de la sintasa de NO y H₂S en la relajación inducida por el rolipram

La ω -CgTX (1 μ M) (Figura 14A,B), la L-NOARG (100 μ M) (Figura 14C) y la PPG (1 mM) (Figura 14D), bloqueantes de los canales VOC neuronales y de las sintasas de NO y de H₂S, respectivamente, redujeron la relajación inducida por el rolipram en el cuello vesical de cerdo.

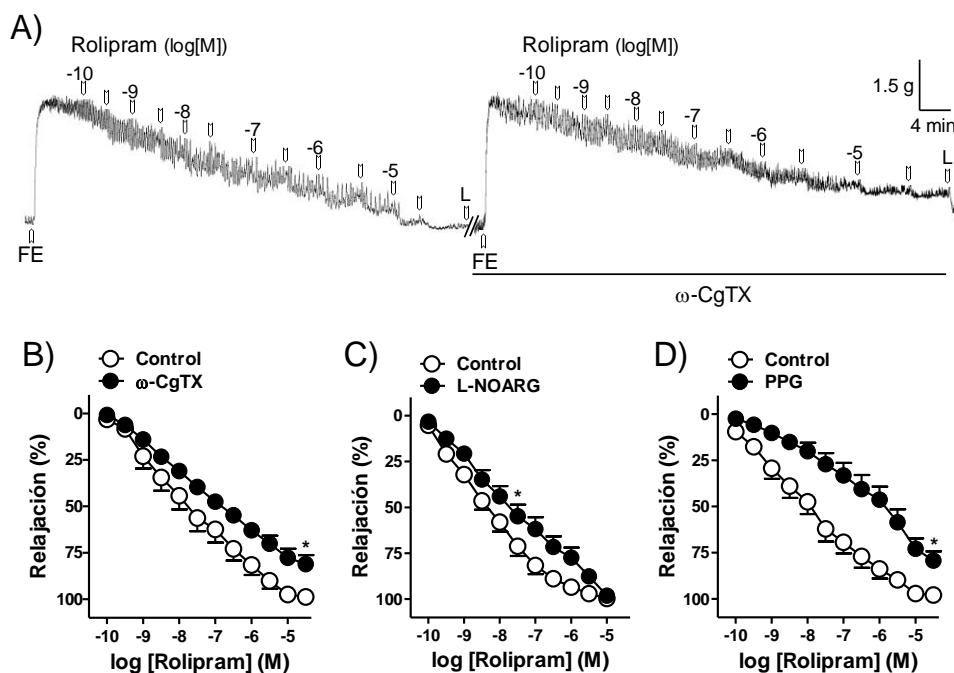


Figura 14 La relajación inducida por el rolipram es mediada indirectamente por la liberación neuronal de NO y H₂S. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el rolipram (0.1 nM-10 μM) en presencia y ausencia del inhibidor selectivo de los canales de Ca⁺ neuronales dependientes de voltaje ω-conotoxina GVIA (ω-CgTX, 1 μM) en las preparaciones del cuello vesical desprovistas de urotelio y precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μM). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B-D) Curvas de relajación dependientes de la concentración del rolipram en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de la ω-CgTX (B), del inhibidor de la sintasa del NO, L-NOARG (100 μM) (C) y del inhibidor de la sintasa de H₂S CSE PPG (1 mM) (D). Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media±e.s.m. de 6-8 preparaciones de 3-4 cerdos. *P<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto al valor control, de acuerdo al test de la *t* de Student para observaciones pareadas.

4.3.2.6. Cambios en la tensión y en la [Ca²⁺]_i del músculo liso del cuello vesical inducidos por el rolipram

Se evaluaron simultáneamente las variaciones en la [Ca²⁺]_i y la tensión en respuesta al rolipram. Los ratios basales Δ(F₃₄₀/F₃₈₀) medios registrados fueron de 0.73 ± 0.02. La estimulación de las muestras con FE (1 μM) indujo incrementos simultáneos

tanto en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta(F_{340}/F_{380}) = 0.31 \pm 0.08$) como en la tensión (1.6 ± 3.5 g) de la musculatura lisa (Figura 15A,B).

El rolipram (1 nM, 0.1 μ M and 10 μ M) redujo la tensión producida por la FE sin originar una disminución significativa del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el agonista adrenérgico α_1 (Figura 15A-C), a diferencia de los resultados obtenidos con el donante de NO, SNAP (1 μ M) que redujo de forma paralela los aumentos de tensión y $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la FE (Figura 15A-C).

La relación de tensión y la $[Ca^{2+}]_i$ obtenida para rolipram (Figura 15D) en las preparaciones de cuello vesical muestra una muy escasa dependencia de la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en la relajación inducida por el inhibidor de la PDE4, indicando así, la implicación de mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} en dicha respuesta.

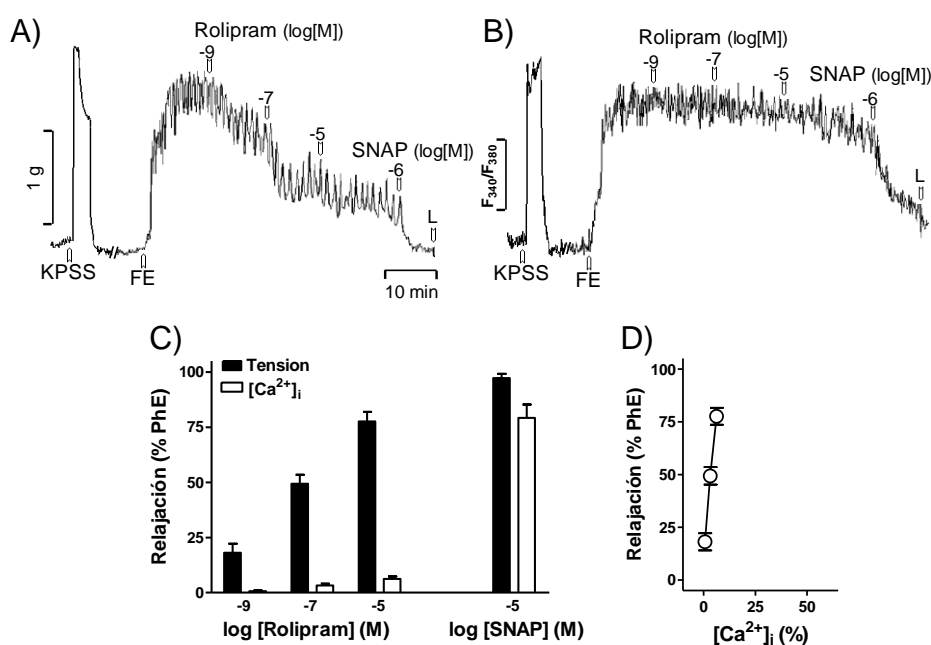


Figura 15. **Implicación de mecanismos de desensibilización del Ca^{2+}_i en la relajación del rolipram.** (A,B) Registros simultáneos de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la tensión inducidos por rolipram (1 nM, 0.1 μ M and 10 μ M) (A) y SNAP (1 μ M) (B) en preparaciones contraídas con la fenilefrina (FE, 1 μ M). (C) Efectos del rolipram y el SNAP sobre los incrementos en la tensión y $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por FE. (D) Relación de la tensión y la $[Ca^{2+}]_i$ para rolipram demostrando la implicación de los mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} . Los datos se expresan como media \pm e.s.m. de 4 preparaciones de 4 animales.

4.3.2.7. Relajación inducida por el rolipram y por los inhibidores de la PDE5 en el cuello de la vejiga del hombre

El rolipram (0.1 nM-10 μ M) (Figura 16A,B) indujo una relajación dependiente de la concentración mucho más potente que la producida por los inhibidores de la PDE5 sildenafil (0.1 nM-30 μ M) (Figura 16B) y vardenafilo (0.1 nM-30 μ M) (Figura 16B) (rolipram>> sildenafil> vardenafilo) en preparaciones de cuello vesical humanas (n= 6 de 3 donantes).

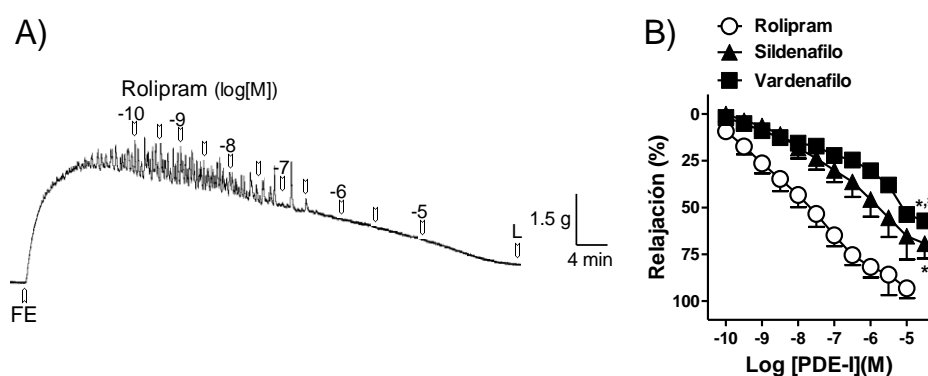


Figura 16. **Relajación inducida por los inhibidores de las PDE 4 y 5 en el cuello vesical del hombre.** (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el rolipram (0.1 nM-10 μ M) en preparaciones desprovistas de urotelio y precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B) Curvas de relajación dependientes de la concentración del rolipram (círculos vacíos), el sildenafil (triángulos llenos) y el vardenafilo (cuadrados llenos). Los resultados representan la media \pm e.s.m. de 6 preparaciones de 3 donantes de órganos. *,# $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto al valor de rolipram y sildenafil, respectivamente, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Bonferroni.

5. DISCUSIÓN

5.1. IMPLICACIÓN DE LA BK EN LA REGULACIÓN DE LA TENSION DE LA MUSCULATURA LISA DEL URÉTER INTRAVESICAL DEL CERDO

Los resultados del presente estudio aportan evidencia morfológica y funcional de la implicación de los receptores de BK B₂ neuronales y musculares en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del uréter intravesical del cerdo. La BK produce contracción a través de los receptores B₂, localizados en el músculo liso, acoplados esencialmente a la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales VOC tipo L. Asimismo, los receptores B₂ presinápticos estimulan la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente e independiente de NO. Esta conclusión está apoyada por las siguientes observaciones: (1) La presencia del receptor B₂ en el músculo liso y en el urotelio, así como en las fibras nerviosas que discurren en paralelo a los haces musculares. (2) La contracción inducida por la BK se redujo drásticamente como consecuencia de la eliminación del Ca²⁺ extracelular y por el bloqueo selectivo del receptor B₂ y de los canales VOC tipo L. (3) La relajación inducida por la EET, en ausencia o presencia del inhibidor de la sintasa del NO, era inhibida como consecuencia del bloqueo selectivo de dichos receptores.

Sobre el tono basal de las preparaciones del uréter intravesical, la BK indujo una potente contracción dependiente de la concentración, no siendo dicha respuesta modificada por la eliminación mecánica del urotelio, sugiriendo así, la participación de los receptores de BK musculares. Esto fue además confirmado mediante estudios inmunohistoquímicos, que revelan la expresión del receptor B₂ en la capa de músculo liso. Estos resultados están de acuerdo con la presencia de fibras musculares inmunorreactivas para el receptor B₂ en el detrusor de la rata (Chopra et al., 2005). La BK es un agonista endógeno de los receptores B₁ y B₂ (Regoli et al., 1998). Esto junto con la falta de efecto sobre el tono basal de las preparaciones del agonista selectivo B₁, calidina y la ausencia de dicho receptor en la capa muscular, está en consonancia con la implicación del receptor B₂ en la contracción bradicinérgica del uréter intravesical. La implicación de este subtipo fue confirmada por la inhibición producida por el antagonista selectivo del receptor B₂, HOE 140. Dicho antagonista produjo un desplazamiento a la derecha de tipo no competitivo de la CCR de la BK, lo cual, puede ser explicado sobre la base de la presencia de receptores neuronales, anteriormente mencionada, y/o la mediación de una población heterogénea de receptores en la

contracción de la BK. Sin embargo, el agonista selectivo de los receptores B_1 no incrementó el tono basal de las preparaciones ureterales y el bloqueo selectivo de dichos receptores no modificó la respuesta contráctil inducida por la BK, descartando así, la implicación de este subtipo en la contracción bradicinérgica del uréter intravesical.

La eliminación mecánica del urotelio no modificó la contracción inducida por la BK, lo cual, parece descartar que receptores B_2 uroteliales estén involucrados en dicho efecto. Estos receptores favorecen la proliferación celular del estroma de la próstata humana, a través de la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos 1 y 2 (Srinivasan et al., 2004). En el presente estudio, ya que los receptores B_2 , localizados en el urotelio, no parecen estar implicados en la regulación de la tensión de la musculatura lisa, su papel podría ser estar relacionado con acciones proliferativas celulares.

La vía de la COX está involucrada en la fisiopatología de la vejiga urinaria. Durante el llenado vesical, la vejiga presenta contracciones espontáneas producidas por la actividad miogénica del detrusor, siendo dicha acción incrementada por la liberación local de prostanoïdes derivados de la COX. De hecho, la COX-1 y la COX-2 están expresadas en las células intersticiales de Cajal en la vejiga urinaria del cobaya y las prostaglandinas, liberadas desde esas células y desde el urotelio, modulan la contractilidad de la pared vesical (de Jongh et al., 2007). Dicha actividad espontánea puede estimular la síntesis y la liberación de neuropéptidos desde las APSC, produciendo, en última instancia, hiperactividad del detrusor (Andersson, 2010). Por esta razón, hemos estudiado la posible implicación de la COX en la contracción inducida por BK. Sin embargo, la indometacina, un inhibidor no selectivo de las COX, no logró modificar las respuestas inducidas por la BK, lo que indica que prostanoïdes derivados de las COX no parecen estar implicados en la contracción bradicinérgica del uréter intravesical.

En la vejiga urinaria, la contracción mediada a través de la conjugación con receptores de membrana es dependiente de la entrada del Ca^{2+} extracelular vía activación de los canales de Ca^{2+} tipo L sensibles a las dihidropiridinas (Andersson et al., 1991) y de la liberación de Ca^{2+} intracelular desde los depósitos intracelulares (Masters et al., 1999). Estudios realizados a nivel de la pelvis renal y del uréter proximal de cobaya (Imaizumi et al., 1990), rata (Smith et al., 2002) y ratón (Lang et al., 2006; Lang et al., 2007), demostraron que la contracción de la musculatura lisa se

produce como consecuencia del influjo del Ca^{2+} extracelular principalmente a través de canales VOC tipo L, y en mucha menor medida, vía otros canales de Ca^{2+} (Maggi et al., 1989). En nuestro estudio, la contracción inducida por concentraciones submaximales de BK en una SSF libre de Ca^{2+} , así como el tratamiento con la nifedipina, bloqueante selectivo de los canales VOC (tipo L), produjo una potente reducción de la contracción inducida por la BK, sugiriendo así, que dicho efecto se produce esencialmente por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} tipo L. Asimismo, otros canales de Ca^{2+} parecen también estar implicados en dicho efecto. Este mecanismo podría incluir canales VOC como son los del tipo T o del tipo P/Q y/o los canales de Ca^{2+} operados por depósito. En el cuello de la vejiga de cerdo, el bloqueo producido por el inhibidor SKF 96365, sugirió que mecanismos de la entrada de Ca^{2+} independientes de la activación de canales VOC tipo L pueden, asimismo, estar involucrados (Ribeiro et al., 2013). La escasa contracción producida por la BK en un medio libre de Ca^{2+} , sugiere que mecanismos dependientes de la movilización del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares no parecen estar involucrados en dicha respuesta. La contracción del músculo liso es, en parte, independiente de los cambios de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico y mediada por mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} . La modulación de la sensibilidad al Ca^{2+} es un mecanismo importante en la respuesta contráctil y la vía de la RhoA/Rho-cinasa tiene un papel esencial. La Rho-cinasa, activada por la forma unida a GTP de la proteína RhoA, regula la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles mediante el control de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). Cuando la Rho-cinasa está activada inhibe a la MLCP dando lugar al incremento de la fosforilación de la misma y a la contracción en ausencia de cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Nakanishi et al., 2009). De hecho, estudios previos han demostrado la presencia de ARNm y de la isoenzima RhoA activada en el urotelio y detrusor de rata (Nakanishi et al., 2009). En el presente estudio, el hecho de que la contracción inducida por la BK no fuera inhibida por el Y 27632 parece descartar la implicación de mecanismos dependientes de la vía de la RhoA/Rho-cinasa en dicho efecto.

En el uréter intravesical del cerdo, el NO y otro/s mediador/es están implicados en la neurotransmisión inhibitoria NANC (Hernández et al., 1995b). El NO produce la relajación del músculo liso ureteral a través de mecanismos dependientes de la guanilato ciclasa soluble involucrando la activación de los canales K_{ATP} (Hernández et al., 1997). En esta estructura, los receptores peptidérgicos, expresados en la membrana de las terminaciones nerviosas, modulan la liberación de neurotransmisores

inhibidores. Asimismo, receptores facilitadores PAC_1 , presentes en las APSC y asociados a la liberación del NO, y los receptores VIP/PACAP inhibidores localizados en las neuronas motoras, están involucrados en las relajaciones inducidas por el PACAP 38 y el VIP, respectivamente, en la musculatura lisa del uréter intravesical (Hernández et al., 2004). Debido a ello, en el presente estudio se investigó la posible implicación de los receptores B_1 y B_2 en la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente e independiente del NO. La inmunohistoquímica mostró la presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas para los receptores B_2 distribuidas a lo largo de los haces musculares, sugiriendo así, un papel de los mismos en los mecanismos de regulación nerviosa. Asimismo, el bloqueo selectivo de dichos receptores, con el antagonista HOE 140, redujo la relajación neurogénica NANC dependiente e independiente de NO. Estos resultados sugieren la presencia de una población de receptores B_2 , localizados en las terminaciones nerviosas, que favorecen la liberación de NO y de otro/s neurotransmisor/es inhibidor/es en el uréter intravesical.

Del conjunto de nuestros resultados podemos sugerir que la BK produce la contracción del uréter intravesical del cerdo a través de los receptores B_2 , localizados en el músculo liso, acoplados esencialmente a la entrada del Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L. Asimismo, se ha demostrado la existencia de receptores B_2 neuronales facilitadores de la transmisión inhibitoria NANC dependiente e independiente del NO (Ribeiro et al., En revisión en *Neurourol Urodyn*).

5.2. IMPLICACIÓN DE LA BK EN LA REGULACIÓN DE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL CUELLO VESICAL DEL CERDO

El presente estudio sugiere que la BK participa en la contractilidad de la musculatura lisa del cuello vesical a través de mecanismos neuronales y no-neuronales. Así, la contracción inducida por la BK está mediada por los receptores musculares B_2 acoplados principalmente al influjo de Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L. Asimismo, receptores B_2 neuronales participan en la modulación de la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente e independiente del NO y receptores B_1 uroteliales producen la relajación del cuello vesical a través de mecanismos dependientes de la COX-1 y de la activación de los canales BK_{Ca} . Esta conclusión es mantenida por los siguientes resultados: 1) La expresión de los receptores B_2 en el músculo liso y en el interior de fibras nerviosas distribuidas a lo largo de la pared muscular y por la presencia de receptores B_1 en el urotelio. 2) La eliminación del Ca^{2+} extracelular y el bloqueo selectivo de los receptores B_2 y de los canales VOC tipo L redujo considerablemente la contracción inducida por la BK. 3) La relajación inducida por el agonista B_1 , calidina, fue prácticamente abolida como consecuencia de la eliminación mecánica del urotelio y del bloqueo de los receptores B_1 , de los canales BK_{Ca} y de la COX-1. 4) La relajación NANC inducida por la EET fue reducida por el bloqueo selectivo de los receptores B_2 .

La BK produjo una potente contracción dependiente de la concentración en las preparaciones músculo liso del cuello vesical desprovistas de urotelio. Además, en las muestras con urotelio intacto, la contracción bradikinérgica era de menor magnitud, sugiriendo así, que receptores de la BK localizados en el músculo liso estarían involucrados en la respuesta contráctil, la cual, sería modulada por la activación de receptores uroteliales relajantes. Esto además fue confirmado con los estudios inmunohistoquímicos que revelaron la expresión de los receptores B_1 y B_2 en el urotelio y en el músculo liso, respectivamente. Dichos resultados son coincidentes con los obtenidos en el urotelio y el detrusor de la rata (Chopra et al., 2005). El hecho de que la BK, agonista endógeno de los receptores bradikinérgicos, presente mayor afinidad para los receptores B_2 que para los B_1 (Regoli et al., 1998) y que el agonista selectivo de los receptores B_1 , calidina no incrementa el tono basal de preparaciones de músculo liso desprovistas de urotelio, sugiere que la contracción inducida por la BK es mediada por

receptores musculares B₂. Asimismo, la disminución de la respuesta contráctil inducida por la BK en presencia del antagonista selectivo de los receptores B₂, HOE 140, confirma la implicación de dicho subtipo. El desplazamiento de la CCR de BK hacia la derecha de forma no competitiva, producida por el HOE 140, estaría en consonancia con la presencia de receptores de BK en las terminaciones nerviosas, anteriormente descrita, y/o a la implicación de ambos subtipos de receptores de BK en dicha respuesta. Sin embargo, la calidina no modificó la tensión basal de las preparaciones y el antagonista selectivo de los receptores B₁, R 892 no redujo la contracción inducida por la BK, descartando así, una posible mediación de dichos receptores.

En la vejiga urinaria, la contracción mediada a través de la unión ligando-receptor depende del influjo de Ca²⁺ desde el medio extracelular a través de canales de Ca²⁺ dependientes e independientes de voltaje (Andersson et al., 1991), así como de la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares (Masters et al., 1999). La eliminación del Ca²⁺ extracelular y el pretratamiento de las preparaciones con la nifedipina, inhibidor de los canales VOC tipo L, redujo la contracción inducida por la BK, sugiriendo así, que dicha respuesta es mediada por receptores B₂ acoplados a la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales de Ca²⁺ tipo L. Sin embargo, la inhibición parcial (32 %) producida por la nifedipina sugiere la implicación de otros canales de Ca²⁺ en dicha respuesta, como son canales VOC tipos T, Q o P o independientes de voltaje, como son los canales de Ca²⁺ activados por ligando u operados por depósito. En nuestro estudio, la inhibición producida por el inhibidor no selectivo de canales de Ca²⁺ de membrana, SKF 96365, sugiere la implicación de otros canales de Ca²⁺ en la contracción inducida por la BK. Asimismo, la eliminación del Ca²⁺ del medio extracelular redujo considerablemente dicha respuesta, indicando que la movilización de Ca²⁺ de los depósitos celulares no parece desempeñar un papel prioritario en la contracción inducida por la BK. En la vejiga urinaria, parte de la respuesta contráctil es independiente de los cambios en la [Ca²⁺]_i, estando relacionada con mecanismos de señalización dependientes de la vía de la Rho/Rho-cinasa y/o de la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (Nakanishi et al., 2009). De hecho, estudios previos han demostrado la presencia de ARNm y de la isoenzima RhoA activada en el urotelio y el detrusor de la rata (Nakanishi et al., 2009). Sin embargo, en el presente estudio, la inhibición de la Rho/RhoA-cinasa, no modificó la contracción inducida por la BK, descartando así, la implicación de esta vía en dicha respuesta.

La inhibición de la contracción obtenida en las preparaciones con urotelio intacto, sugirió la presencia de los receptores bradikinérgicos uroteliales que podrían estar involucrados en la relajación del cuello vesical. De hecho, en preparaciones previamente contraídas con FE, el agonista selectivo de los receptores B_1 calidina produjo una relajación dependiente de la concentración. Dicha respuesta fue considerablemente reducida en presencia del antagonista selectivo de los receptores B_1 R 892 y abolida como consecuencia de la eliminación mecánica del urotelio, sugiriendo así, la presencia de una población de receptores B_1 uroteliales relajantes. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la tráquea del ratón, en donde receptores B_1 uroteliales producen relajación de la musculatura lisa (Trevisani et al., 1999). La relajación bradikinérgica dependiente de epitelio puede estar producida por la liberación de NO neuronal y endotelial, de prostanoïdes derivados de la COX y/o tirosina cinasas (Schlemper et al., 2005). En el presente estudio, el bloqueo de la sintasa de NO con L-NOARG no modificó la respuesta inducida por calidina, descartando una posible mediación de NO en la relajación mediada vía receptores B_1 . Sin embargo, la indometacina, inhibidor no selectivo de las COX, incrementó la contracción bradikinérgica en muestras desprovistas de urotelio y la incubación con la indometacina y el SC 560, inhibidor selectivo de la COX-1, redujeron la relajación inducida por calidina, sugiriendo que prostanoïdes derivados de la COX-1 estarían involucrados en la relajación bradikinérgica del cuello vesical.

La relajación mediada a través de los receptores B_1 en la musculatura lisa vascular es producida vía mecanismos dependientes de la activación de canales BK_{Ca} (Farias et al., 2005). En nuestro estudio, la precontracción inducida por una SSFK (80 mM) redujo drásticamente la relajación inducida por calidina. Ya que la elevación del K^+ extracelular inhibe la salida de este ión y que el bloqueo selectivo de los canales BK_{Ca} redujo la respuesta de calidina, parece probable que modificaciones de la conductancia iónica vía activación de dichos canales estén involucradas en la relajación mediada a través de los receptores B_1 .

En el cuello de la vejiga de cerdo, el NO (Hernández et al., 2007; Hernández et al., 2008) y el H_2S (Fernandes et al., 2013a; Fernandes et al., 2013b), desempeñan un papel esencial en la neurotransmisión inhibitoria, la cual, está modulada vía activación de receptores presinápticos adrenérgicos y peptidérgicos. Así, los receptores adrenérgicos α_2 (Hernández et al., 2007) y los receptores de endotelina ET_A (Arteaga et al., 2012b) inhiben la liberación de dichos neurotransmisores. Asimismo, receptores facilitadores

PAC₁, localizados en APSC, y receptores inhibidores VPAC, expresados en la membrana de las terminaciones motoras, están involucrados en la relajación del cuello vesical inducida por el PACAP 38 y el VIP, respectivamente (Hernández et al., 2006). Debido a ello, en el presente estudio se ha investigado el posible papel de los receptores de BK en la neurotransmisión inhibidora NANC. La inmunohistoquímica reveló la presencia de receptores B₂ en fibras nerviosas que discurren a lo largo de la pared capa muscular. Asimismo, el bloqueo selectivo de dichos receptores con HOE 140 redujo la relajación neurogénica NANC dependiente e independiente de NO. Estos resultados sugieren que, junto con los receptores musculares B₂ implicados en la respuesta contráctil de la BK, existiría una población de receptores B₂ neuronales facilitadores, los cuales, estimularían la liberación de NO y H₂S en el cuello vesical.

Los resultados de la presente investigación indican que la BK produce contracción del cuello de la vejiga del cerdo a través de la activación de receptores B₂, acoplados esencialmente a la entrada de Ca²⁺ extracelular vía canales VOC tipo L. Asimismo, se demuestra la existencia de receptores B₂ neuronales facilitadores de la transmisión inhibidora NANC, y receptores B₁ uroteliales que promueven la relajación del cuello vesical a través de mecanismos dependientes de la vía de la COX y de la activación de los canales BK_{Ca} (Ribeiro et al., 2013).

5.3. IMPLICACIÓN DEL INHIBIDOR DE LA PDE4 ROLIPRAM EN LA REGULACIÓN DE LA TENSIÓN DE LA MUSCULATURA LISA DEL CUELLO VESICAL

Los resultados de la presente investigación muestran una rica expresión de la PDE4 en el músculo liso del cuello vesical del cerdo y del hombre. Asimismo, rolipram, un inhibidor selectivo de la PDE4, produjo una relajación del cuello de la vejiga, en ambas especies, de mucha mayor magnitud que la producida por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafil.

La presencia de una elevada densidad de fibras inmunoreactivas para la PDE4 en la capa muscular sugería la posibilidad de que bloqueantes selectivos de dicha enzima, como el rolipram, podrían desempeñar un papel fundamental en la contractilidad del cuello vesical. Estos resultados están de acuerdo con los que se han obtenido en el detrusor y la próstata del hombre, en donde se observaron una marcada expresión de PDE4, reforzando así, el papel de esta enzima en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del Tracto Urinario Inferior (Uckert et al., 2009; Waldkirch et al., 2010).

El rolipram produjo una relajación dependiente de la concentración en preparaciones de músculo liso previamente contraídas con la FE. Dicha respuesta no fue modificada en preparaciones con el urotelio intacto y en presencia de inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, ODQ, sugiriendo así, la implicación de un mecanismo independiente del urotelio y de la vía del GMPc en dicha relajación.

Las vías de las COX desempeñan un papel fundamental en la Fisiología y Fisiopatología de la vejiga urinaria. De hecho, prostanoïdes derivados de las COX participan en la regulación de la tensión muscular de la pared vesical (de Jongh et al., 2007). Durante la fase de llenado, la vejiga urinaria, muestra contracciones y relajaciones locales producidas por la actividad miogénica basal, la cual, puede ser incrementada como consecuencia de la liberación local de prostaglandinas. Estas contracciones espontáneas dan lugar a un incremento en la síntesis y liberación de péptidos desde las APSC, responsable de la hiperactividad del detrusor (Andersson, 2010). En el presente estudio, sin embargo, la inhibición de la COX con indometacina, no modificó la relajación inducida por el rolipram, descartando así, una posible mediación de prostanoïdes derivados de la COX en dicha respuesta.

La relajación del músculo liso mediada a través del incremento de la $[AMPc]_i$ es producida vía activación de la PKA (Vaudry et al., 2000). El incremento de los niveles de AMPc citosólico, así como, la intensidad y duración de sus efectos fisiológicos están regulados por la síntesis de AMPc, vía activación de la adenilato ciclasa, y su hidrólisis por la acción de la PDE4 (Ekholm et al., 1997). Dicho enzima hidroliza específicamente el AMPc, regulando así, las concentraciones intracelulares de este nucleótido cíclico (Matsumoto et al., 2003; Wheeler et al., 2005). La vía de la PKA participa en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del cuello de la vejiga del cerdo. De hecho, receptores VIP/PACAP ($VPAC_2$) y receptores serotoninérgicos $5-HT_7$, median la relajación inducida por el PACAP 38 (Hernández et al., 2006) y la 5-HT (Recio et al., 2009), respectivamente, a través de mecanismos de señalización intracelular relacionados con la activación de la PKA. En el presente estudio, el inhibidor de la PKA, KT5720, redujo la relajación inducida por el rolipram y una concentración umbral del activador de la adenilato ciclasa forskolina, potenció dicha respuesta, resultados que demuestran la implicación de vía de la PKA en la relajación inducida por el rolipram en el cuello vesical.

Los canales de K^+ modulan la actividad contráctil de la pared de la vejiga urinaria, regulando la repolarización de los potenciales de acción y participando en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, limitando así, la amplitud y la duración de la contracción de la musculatura lisa de la pared vesical (Herrera et al., 2005). En el cuello de la vejiga de cerdo, los canales BK_{Ca} y los SK_{Ca} están implicados en la relajación del cuello vesical mediada a través de los receptores de la endotelina ET_B (Arteaga et al., 2012a). Por este motivo, se ha investigado el papel de canales K_{Ca} en la relajación inducida por el rolipram. El bloqueo de los canales SK_{Ca} no modificó dicha respuesta, lo cual, descarta su posible implicación. Sin embargo, la inhibición selectiva de los canales BK_{Ca} e IK_{Ca} con la IbTX y el TRAM34, respectivamente, redujeron dicha relajación. El incremento en la concentración de K^+ extracelular inhibe la salida de dicho ión a través de sus canales de membrana, por lo que la reducción de la relajación de rolipram obtenida en preparaciones contraídas con una SSFK y en presencia de los bloqueantes de los canales BK_{Ca} e IK_{Ca} podría ser explicado sobre la base de que modificaciones en la conductancia iónica vía canales BK_{Ca} e IK_{Ca} estarían involucradas en dicha respuesta. El tratamiento conjunto de IbTX y/o TRAM34 con KT5720 no produjo una inhibición de la relajación del rolipram mayor que la producida por la IbTX o el TRAM34 de forma individualizada, sugiriendo así, que la activación de los

canales BK_{Ca} e IK_{Ca} es probablemente debida a mecanismos dependientes de la vía AMPc/PKA, y no a través de dos vías diferenciadas, una relacionada con la activación de la PKA y otra referida a la activación de ambos tipos de canales K_{Ca} (Lee et al., 1999). En nuestro estudio, la respuesta inducida por el rolipram era producida independientemente de la disminución en la $[Ca^{2+}]_i$. La relajación del músculo liso sin comportar cambios en la $[Ca^{2+}]$ citosólico es debida a mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} de los microfilamentos del miocito. Uno de los mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} más importante es la inhibición de la vía de la Rho/RhoA-cinasa que lleva a la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) (Somlyo & Somlyo, 2003). Este mecanismo puede, asimismo, involucrar la inhibición de la fosforilación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), por activación de la proteína cinasa II dependiente del complejo Ca^{2+} /calmodulina (Tansey et al., 1994). Por este motivo, mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} , probablemente vía inhibición de una de estas cinasas, podrían estar involucrados en la relajación inducida por el rolipram en el cuello vesical.

Los canales K_{ATP} desempeñan un papel primordial en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del Tracto Urinario (Brading, 1992). Así, dichos canales favorecen la hiperpolarización de la membrana de la célula muscular, reduciendo la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje y el influjo del Ca^{2+} extracelular (Bonev & Nelson, 1993; Foster, 1998). De hecho, activadores específicos de dichos canales inhiben la actividad mecánica de la vejiga de la rata y cobaya, así como las contracciones del detrusor del hombre en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. En el cuello de la vejiga del cerdo, los canales K_{ATP} están involucrados en la relajación neurogénica producida por el NO (Hernández et al., 2008) y el H_2S (Fernandes et al., 2013a). En el presente estudio, sin embargo, el bloqueo de dichos canales con la glibenclamida no modificó la respuesta inducida por el rolipram, descartando, así su posible implicación.

En el cuello de la vejiga del cerdo, canales K_V de localización presináptica modulan la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica y sulfidrérgica, como consecuencia del bloqueo de la entrada de Ca^{2+} en la terminación nerviosa (Hernández et al., 2008; Fernandes et al., 2013a). Asimismo, canales K_V postsinápticos están involucrados en la relajación del cuello vesical inducida por el PACAP 38 (Hernández et al., 2006). El bloqueo de los canales K_V con la 4-AP originó un desplazamiento hacia la izquierda de la CCR de rolipram, lo que sugiere que canales K_V presinápticos estarían modulando

dicha relajación. Estos resultados junto con el hecho que inhibidores de la PDE5 en combinación con la tamsulosina, antagonista de los receptores adrenérgicos α_{1A} , incrementen la inhibición de la contracción neurogénica en el cuello de la vejiga humana, sugiere que los inhibidores de las PDE 4 y 5 desempeñan un papel fundamental en los procesos de neurotransmisión de la base de la vejiga (Angulo et al., 2012). En nuestro estudio, la ω -CgTX, un inhibidor de los canales VOC neuronales, redujo la respuesta inducida por el rolipram, por lo que inhibidores de la PDE4 ejercen una acción facilitadora de la neurotransmisión inhibitoria. El NO (Hernández et al., 2008) y el H₂S (Fernandes et al., 2013b) son responsables de la transmisión inhibitoria NANC del cuello vesical. Por este motivo quisimos investigar si una parte de la relajación del rolipram era producida indirectamente a través de la liberación de dichos neurotransmisores gaseosos. La inhibición de la sintasa de NO y de la enzima de síntesis de H₂S, CSE, redujo la relajación inducida por el rolipram. Este hecho junto con la presencia de la PDE4 en fibras nerviosas de la pared vesical sugiere que dicha respuesta es producida, en parte, vía liberación de NO y H₂S desde nervios intramurales del cuello de la vejiga. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el detrusor del hombre, en donde la relajación inducida por el inhibidor de la PDE5, sildenafil, es producida indirectamente vía liberación del H₂S neuronal (Fusco et al., 2012).

En preparaciones de cuello de vejiga urinaria humana, la relajación inducida por el rolipram fue muchísimo más potente que la producida por los inhibidores de las PDE5, sildenafil y vardenafil. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la próstata humana, en donde se ha demostrado una abundante presencia de la PDE4 y una relajación de rolipram de mayor magnitud que la promovida por los inhibidores de la PDE5 (Kedia et al., 2009; Waldkirch et al., 2010). Esto junto con el hecho que el rolipram no tiene efectos significativos sobre la circulación sistémica in vivo (Becker et al., 1998) plantea la posibilidad del uso de inhibidores de la PDE4, solos o en combinación con inhibidores de la PDE5, para la relajación de la región de salida de la vejiga en pacientes con STUI.

En conclusión, estos resultados muestran una abundante presencia de la PDE4 en el músculo liso del cuello de la vejiga del cerdo y del hombre, en donde el inhibidor de dicho enzima rolipram produce una relajación muchísimo más potente que la originada por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafil. En el cerdo, la relajación inducida por el rolipram es producida a través de la PKA involucrando la

activación de canales BK_{Ca} e IK_{Ca} y mecanismos dependientes de la desensibilización al $[Ca^{2+}]_i$, siendo parte de dicho efecto producido, asimismo, vía liberación de NO y H_2S desde los nervios intramurales del cuello vesical (Ribeiro et al., 2014).

6. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha investigado el papel de los receptores de la BK B₁ y B₂ en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del uréter intravesical y del cuello de la vejiga urinaria de cerdo, así como la relajación inducida por el inhibidor de la PDE4, rolipram, en comparación con la inducida por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafil, en el cuello de la vejiga de cerdo y del hombre. Del conjunto de nuestros resultados podemos concluir:

1. La BK produce contracción del uréter intravesical del cerdo a través de la activación de receptores B₂, presentes en el músculo liso, acoplados principalmente a la entrada del Ca²⁺ extracelular vía canales VOC tipo L. Asimismo, receptores B₂, localizados en las terminaciones nerviosas motoras, estimulan la neurotransmisión inhibitoria NANC ureteral dependiente e independiente del NO.
2. El hecho que receptores B₂ estén implicados en la potente contracción inducida por la BK en el uréter intravesical, plantea el posible uso de agonistas selectivos de dichos receptores para originar la contracción y el cierre del uréter distal en el reflujo vésicoureteral. Asimismo, antagonistas de los receptores B₂ e inhibidores de canales VOC tipo L, podrían ser de utilidad terapéutica como antiespasmódicos en procesos obstructivos, al promover la relajación de la musculatura lisa y favorecer la progresión de cálculos enclavados en la pared ureteral.
3. La BK induce un efecto dual sobre la tensión del músculo liso del cuello de la vejiga del cerdo. Así, sobre la tensión basal de las preparaciones, la BK origina una acción contráctil mediada a través de la activación de receptores B₂, acoplados esencialmente a la entrada de Ca²⁺ extracelular vía canales VOC tipo L. Sin embargo, en muestras previamente contraídas, el agonista selectivo de los receptores B₁, calidina, promueve la relajación del cuello vesical vía receptores de la BK, localizados en el urotelio, a través de mecanismos dependientes de la activación de la COX-1 y de canales BK_{Ca}. Además, se demuestra la existencia de receptores B₂ presinápticos facilitadores de la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical mediada por el NO y el H₂S.

4. En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo y del hombre existe una marcada presencia de la PDE4. En esta estructura, el inhibidor selectivo de dicho enzima rolipram promueve una relajación mucho más potente que la originada por los inhibidores de la PDE5 sildenafil y vardenafilo. En el cerdo, la relajación inducida por el rolipram es producida a través de la vía de la PKA involucrando la activación de canales BK_{Ca} e IK_{Ca} , así como, mecanismos dependientes de la desensibilización del $[Ca^{2+}]_i$. Dicho efecto es, asimismo, producido vía liberación del NO y el H_2S desde los nervios intramurales del cuello vesical.
5. Los agonistas de los receptores B_2 podrían ser de utilidad terapéutica en la IU de estrés producida por deficiencia esfintérica intrínseca por promover la contracción y el cierre del esfínter uretral interno. Asimismo, antagonistas de dichos receptores y bloqueantes de los canales VOC tipo L y de la PDE4 podrían efectivos en el tratamiento del cuadro obstructivo del STUI secundario a la HBP.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A & Wein A. (2002). The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 21, 167-178.
- Abrams P, Cardozo L & Wein A. (2010). The International Consultation on Incontinence, Research Society (ICI-RS). *Neurourol Urodyn* 29, 596-597.
- Aizawa N, Igawa Y, Andersson KE, Iijima K, Nishizawa O & Wyndaele JJ. (2011). Effects of intravesical instillation of ATP on rat bladder primary afferent activity and its relationship with capsaicin-sensitivity. *Neurourol Urodyn* 30, 163-168.
- Andersson KE. (1992). Clinical pharmacology of potassium channel openers. *Pharmacol Toxicol* 70, 244-254.
- Andersson KE. (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59, 43-50.
- Andersson KE. (2007). LUTS treatment: future treatment options. *Neurourol Urodyn* 26, 934-947.
- Andersson KE. (2010). Detrusor myocyte activity and afferent signaling. *Neurourol Urodyn* 29, 97-106.
- Andersson KE & Arner A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 84, 935-986.
- Andersson KE & Forman A. (1978). Effects of prostaglandins on the smooth muscle of the urinary tract. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 43 Suppl 2, 90-95.
- Andersson KE, Gratzke C & Hedlund P. (2010). The role of the transient receptor potential (TRP) superfamily of cation-selective channels in the management of the overactive bladder. *BJU Int* 106, 1114-1127.
- Andersson KE, Holmquist F, Fovaeus M, Hedlund H & Sundler R. (1991). Muscarinic receptor stimulation of phosphoinositide hydrolysis in the human isolated urinary bladder. *J Urol* 146, 1156-1159.
- Andersson KE, Uckert S, Stief C & Hedlund P. (2007). Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. *Neurourol Urodyn* 26, 928-933.
- Anger JT, Saigal CS & Litwin MS. (2006). The prevalence of urinary incontinence among community dwelling adult women: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *J Urol* 175, 601-604.
- Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, La Fuente JM, Allona A, Moncada I & Saenz de Tejada I. (2012). Tadalafil enhances the inhibitory effects of tamsulosin on neurogenic contractions of human prostate and bladder neck. *J Sex Med* 9, 2293-2306.
- Apodaca G. (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5, 117-128.
- Apodaca G, Balestreire E & Birder LA. (2007). The uroepithelial-associated sensory web. *Kidney Int* 72, 1057-1064.
- Arms L & Vizzard MA. (2011). Neuropeptides in lower urinary tract function. *Handb Exp Pharmacol*, 395-423.

- Arner A & Pfitzer G. (1999). Regulation of cross-bridge cycling by Ca^{2+} in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134, 63-146.
- Arteaga JL, Orensanz LM, Martínez MP, Barahona MV, Martínez-Sáenz A, Fernandes VS, Bustamante S, Carballido J, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2012a). Endothelin ET(B) receptors are involved in the relaxation to the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* 31, 688-694.
- Arteaga JL, Orensanz LM, Martínez MP, Barahona MV, Recio P, Martínez-Sáenz A, Fernandes VS, Ribeiro AS, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2012b). Mechanisms involved in endothelin-1-induced contraction of the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* 31, 156-161.
- Avelino A & Cruz F. (2006). TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373, 287-299.
- Aydin M, Downing K, Villegas G, Zhang X, Chua R, Melman A & Disanto ME. (2010). The sphingosine-1-phosphate pathway is upregulated in response to partial urethral obstruction in male rats and activates RhoA/Rho-kinase signalling. *BJU Int* 106, 562-571.
- Backlund L & Nordgren L. (1966). Pressure variations in the upper urinary tract and kidney at total ureteric occlusion. *Acta Soc Med Ups* 71, 285-301.
- Badawi JK, Seja T, Ucelehan H, Honeck P, Kwon ST, Bross S & Langbein S. (2007). Relaxation of human detrusor muscle by selective beta-2 and beta-3 agonists and endogenous catecholamines. *Urology* 69, 785-790.
- Baek M & Kim KD. (2013). Current surgical management of vesicoureteral reflux. *Korean J Urol* 54, 732-737.
- Bagate K, Grima M, Imbs JL, Jong WD, Helwig JJ & Barthelmebs M. (2001). Signal transduction pathways involved in kinin B(2) receptor-mediated vasodilation in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 132, 1735-1742.
- Bascands JL, Schanstra JP, Couture R & Girolami JP. (2003). [Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles]. *Med Sci (Paris)* 19, 1093-1100.
- Baskin L, DiSandro M, Li Y, Li W, Hayward S & Cunha G. (2001). Mesenchymal-epithelial interactions in bladder smooth muscle development: effects of the local tissue environment. *J Urol* 165, 1283-1288.
- Bayliss M, Wu C, Newgreen D, Mundy AR & Fry CH. (1999). A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. *J Urol* 162, 1833-1839.
- Bean BP. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86, 1-30.
- Beckel JM, Kanai A, Lee SJ, de Groat WC & Birdier LA. (2006). Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F103-110.
- Becker AJ, Stief CG, Meyer M, Truss MC, Forssmann WG & Jonas U. (1998). The effect of the specific phosphodiesterase-IV-inhibitor rolipram on the ureteral peristalsis of the rabbit in vitro and in vivo. *J Urol* 160, 920-925.

- Bellucci F, Cucchi P, Santicoli P, Lazzeri M, Turini D & Meini S. (2007). Characterization of kinin receptors in human cultured detrusor smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 150, 192-199.
- Benyajati C. (1986). Comparative study of Baralgin and hyoscine-N-methyl bromide in the treatment of intestinal and renal colic pain. *J Med Assoc Thai* 69, 569-573.
- Berkefeld H & Fakler B. (2013). Ligand-gating by Ca^{2+} is rate limiting for physiological operation of BK(Ca) channels. *J Neurosci* 33, 7358-7367.
- Berkefeld H, Fakler B & Schulte U. (2010). Ca^{2+} -activated K^{+} channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* 90, 1437-1459.
- Berridge MJ. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Berridge MJ. (2007). Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochem Soc Symp*, 1-7.
- Berridge MJ. (2008). Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* 586, 5047-5061.
- Bhatia M. (2005). Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life* 57, 603-606.
- Bhoola KD, Figueroa CD & Worthy K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44, 1-80.
- Bicalho MB & Lopes MH. (2012). [The impact of urinary incontinence of the lives of wives of men with incontinence: an integrative review]. *Rev Esc Enferm USP* 46, 1009-1014.
- Biers SM, Reynard JM, Doore T & Brading AF. (2006). The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor. *BJU Int* 97, 612-616.
- Birder L & Andersson KE. (2013). Urothelial signaling. *Physiol Rev* 93, 653-680.
- Birder LA. (2001). Involvement of the urinary bladder urothelium in signaling in the lower urinary tract. *Proc West Pharmacol Soc* 44, 85-86.
- Birder LA. (2005). More than just a barrier: urothelium as a drug target of urinary bladder pain. *Am J Physiol* 289, F489-495.
- Birder LA. (2006). Urinary bladder urothelium: molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascul Pharmacol* 45, 221-226.
- Birder LA, Apodaca G, De Groat WC & Kanai AJ. (1998). Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. *Am J Physiol* 275, F226-229.
- Birder LA & de Groat WC. (2007). Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 4, 46-54.
- Birder LA, Kanai AJ, Cruz F, Moore K & Fry CH. (2010). Is the urothelium intelligent? *Neurourol Urodyn* 29, 598-602.
- Boari B & Manfredini R. (2003). [Circadian rhythm and renal colic]. *Recenti Prog Med* 94, 191-193.
- Bolton TB. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59, 606-718.

- Bonev AD & Nelson MT. (1993). Muscarinic inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels by protein kinase C in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol* 265, C1723-1728.
- Braas KM, May V, Zvara P, Nausch B, Kliment J, Dunleavy JD, Nelson MT & Vizzard MA. (2006). Role for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in cystitis-induced plasticity of micturition reflexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R951-962.
- Brading AF. (1992). Ion channels and control of contractile activity in urinary bladder smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 58 Suppl 2, 120p-127p.
- Braverman AS, Tibb AS & Ruggieri MR, Sr. (2006). M2 and M3 muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. I. Normal rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 869-874.
- Breil I, Koch T, Goldberg S, Neuhof H & van Ackern K. (1995). Influence of B2 receptor antagonists on bradykinin-induced vasodilation and edema formation in isolated rabbit hindlimbs. *Inflamm Res* 44, 212-216.
- Brough RJ, Lancashire MJ, Prince JR, Rose MR, Prescott MC, Payne SR & Testa HJ. (1998). The effect of diclofenac (voltage) and pethidine on ureteric peristalsis and the isotope renogram. *Eur J Nucl Med* 25, 1520-1523.
- Bruzziches R, Francomano D, Gareri P, Lenzi A & Aversa A. (2013). An update on pharmacological treatment of erectile dysfunction with phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Expert Opin Pharmacother* 14, 1333-1344.
- Buckner SA, Milicic I, Daza AV, Coghlan MJ & Gopalakrishnan M. (2002). Spontaneous phasic activity of the pig urinary bladder smooth muscle: characteristics and sensitivity to potassium channel modulators. *Br J Pharmacol* 135, 639-648.
- Burcher E, Zeng XP, Strigas J, Shang F, Millard RJ & Moore KH. (2000). Autoradiographic localization of tachykinin and calcitonin gene-related peptide receptors in adult urinary bladder. *J Urol* 163, 331-337.
- Burnstock G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-581.
- Burnstock G. (2001). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 22, 182-188.
- Burnstock G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797.
- Burnstock G. (2011). Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci (Elite Ed)* 3, 896-900.
- Burnstock G. (2013). Purinergic signalling in the lower urinary tract. *Acta Physiol (Oxf)* 207, 40-52.
- Burnstock G, Cocks T, Crowe R & Kasakov L. (1978). Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol* 63, 125-138.
- Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, Contreras J, García-Sacristán A & Hernández M. (2000). Tachykininergic excitatory neurotransmission in the pig intravesical ureter. *J Urol* 164, 1371-1375.

- Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, García-Sacristán A & Hernández M. (2001). NK2 tachykinin receptors mediate contraction of the pig intravesical ureter: tachykinin-induced enhancement of non-adrenergic non-cholinergic excitatory neurotransmission. *Neurourol Urodyn* 20, 297-308.
- Bustamante S, Orensanz LM, Recio P, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2010). Functional evidence of nitrergic neurotransmission in the human urinary bladder neck. *Neurosci Lett* 477, 91-94.
- Calvert RC, Thompson CS & Burnstock G. (2008). ATP release from the human ureter on distension and P2X(3) receptor expression on suburothelial sensory nerves. *Purinergic Signal* 4, 377-381.
- Cannon TW, Yoshimura N & Chancellor MB. (2003). Innovations in pharmacotherapy for stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 14, 367-372.
- Carter MR & Green BR. (2011). Renal calculi: emergency department diagnosis and treatment. *Emerg Med Pract* 13, 1-17; quiz 18.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Cervero F & Sann H. (1989). Mechanically evoked responses of afferent fibres innervating the guinea-pig's ureter: an in vitro study. *J Physiol* 412, 245-266.
- Chapple C. (2010). Antimuscarinics in men with lower urinary tract symptoms suggestive of bladder outlet obstruction due to benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol* 20, 43-48.
- Chapple CR, Yamanishi T & Chess-Williams R. (2002). Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder. *Urology* 60, 82-88; discussion 88-89.
- Chauhan V, Eskin B, Allegra JR & Cochrane DG. (2004). Effect of season, age, and gender on renal colic incidence. *Am J Emerg Med* 22, 560-563.
- Chess-Williams R. (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol* 22, 133-145.
- Chong J, Poole P, Leung B & Black PN. (2011). Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd002309.
- Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel JM, Zeidel ML, Ford AP, de Groat WC & Birder LA. (2005). Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* 562, 859-871.
- Chow KY, Wu C, Sui GP & Fry CH. (2003). Role of the T-type Ca²⁺ current on the contractile performance of guinea pig detrusor smooth muscle. *Neurourol Urodyn* 22, 77-82.
- Chung DE & Kaplan SA. (2010). Current role for combination therapy in male LUTS. *Arch Esp Urol* 63, 323-332.
- Cole SW & Lundquist LM. (2013). Icatibant for the treatment of hereditary angioedema. *Ann Pharmacother* 47, 49-55.
- Constantinou CE. (1974). Renal pelvic pacemaker control of ureteral peristaltic rate. *Am J Physiol* 226, 1413-1419.

- Constantinou CE. (1978). Contractility of the pyeloureteral pacemaker system. *Urol Int* 33, 399-416.
- Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmeier RW & Keren R. (2007). Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *Jama* 298, 179-186.
- Cortijo J, Marti-Cabrera M, Berto L, Anton F, Carrasco E, Grau M & Morcillo EJ. (1997). Pharmacological activity of PF-904 in guinea pig in vivo, and on human bronchus and neutrophils in vitro. *Eur J Pharmacol* 333, 69-78.
- Cortijo J, Villagrasa V, Pons R, Berto L, Marti-Cabrera M, Martinez-Losa M, Domenech T, Beleta J & Morcillo EJ. (1999). Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *Br J Pharmacol* 127, 1641-1651.
- Coussin F, Macrez N, Morel JL & Mironneau J. (2000). Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca(2+)-induced Ca(2+) release in vascular myocytes. *J Biol Chem* 275, 9596-9603.
- Coyne KS, Wein A, Nicholson S, Kvasz M, Chen CI & Milsom I. (2013). Comorbidities and personal burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Int J Clin Pract* 67, 1015-1033.
- Creed KE & Callahan SM. (1989). Prostaglandins and neurotransmission at the guinea pig and rabbit urinary bladder. *Pflugers Arch* 413, 299-302.
- D'Andrea MR, Saban MR, Nguyen NB, Andrade-Gordon P & Saban R. (2003). Expression of protease-activated receptor-1, -2, -3, and -4 in control and experimentally inflamed mouse bladder. *Am J Pathol* 162, 907-923.
- Dahl TD, Hultstrom M, Iversen BM & Helle F. (2011). Adenosine sensitization after angiotensin II stimulation in afferent arterioles from normal rats does not occur during two-kidney, one-clip hypertension. *Acta Physiol (Oxf)* 201, 289-294.
- Dall'era JE, Kim F & Chandhoke PS. (2005). Gender Differences among Hispanics and Caucasians in symptomatic presentation of kidney and ureteral stones. *J Endourol* 19, 283-286.
- Dalsgaard T, Kroigaard C, Bek T & Simonsen U. (2009). Role of calcium-activated potassium channels with small conductance in bradykinin-induced vasodilation of porcine retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 3819-3825.
- Damaser MS, Kim KB, Longhurst PA, Wein AJ & Levin RM. (1997). Calcium regulation of urinary bladder function. *J Urol* 157, 732-738.
- Darblade B, Behr-Roussel D, Oger S, Hieble JP, Lebreton T, Gorny D, Benoit G, Alexandre L & Giuliano F. (2006). Effects of potassium channel modulators on human detrusor smooth muscle myogenic phasic contractile activity: potential therapeutic targets for overactive bladder. *Urology* 68, 442-448.
- Darge K & Riedmiller H. (2004). Current status of vesicoureteral reflux diagnosis. *World J Urol* 22, 88-95.

- Datta SN, Roosen A, Pullen A, Popat R, Rosenbaum TP, Elneil S, Dasgupta P, Fowler CJ & Apostolidis A. (2010). Immunohistochemical expression of muscarinic receptors in the urothelium and suburothelium of neurogenic and idiopathic overactive human bladders, and changes with botulinum neurotoxin administration. *J Urol* 184, 2578-2585.
- Davenport K, Timoney AG & Keeley FX. (2005). Conventional and alternative methods for providing analgesia in renal colic. *BJU Int* 95, 297-300.
- Davies AM, Batchelor TJ, Eardley I & Beech DJ. (2002). Potassium channel KV alpha1 subunit expression and function in human detrusor muscle. *J Urol* 167, 1881-1886.
- de Groat WC. (2006). Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 2, S25-40.
- de Groat WC. (2013). Highlights in basic autonomic neuroscience: contribution of the urothelium to sensory mechanisms in the urinary bladder. *Auton Neurosci* 177, 67-71.
- de Jongh R, van Koevinge GA, van Kerrebroeck PE, Markerink-van Ittersum M, de Vente J & Gillespie JI. (2007). The effects of exogenous prostaglandins and the identification of constitutive cyclooxygenase I and II immunoreactivity in the normal guinea pig bladder. *BJU Int* 100, 419-429.
- Dellabella M, Milanese G & Muzzonigro G. (2003). Efficacy of tamsulosin in the medical management of juxta-vesical ureteral stones. *J Urol* 170, 2202-2205.
- Desgrandchamps F, Moulinier F, Cochand-Priollet B, Wassef M, Teillac P & Le Duc A. (1997). Microscopic Study of the Pig Ureteral Urothelium. *The Journal of Urology* 157, 1926-1927.
- Diamant Z & Spina D. (2011). PDE4-inhibitors: a novel, targeted therapy for obstructive airways disease. *Pulm Pharmacol Ther* 24, 353-360.
- Dickson A, Avelino A, Cruz F & Ribeiro-da-Silva A. (2006). Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience* 141, 1633-1647.
- Dinckan A, Aliosmanoglu I, Kocak H, Gunseren F, Mesci A, Ertug Z, Yucel S, Suleymanlar G & Gurkan A. (2013). Surgical correction of vesico-ureteric reflux for recurrent febrile urinary tract infections after kidney transplantation. *BJU Int* 112, E366-371.
- Ding HL, Ryder JW, Stull JT & Kamm KE. (2009). Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation. *J Biol Chem* 284, 15541-15548.
- Dingwall L. (2008). Promoting effective continence care for older people: a literature review. *Br J Nurs* 17, 166-172.
- Diokno AC, Estanol MV, Ibrahim IA & Balasubramaniam M. (2007). Prevalence of urinary incontinence in community dwelling men: a cross sectional nationwide epidemiological survey. *Int Urol Nephrol* 39, 129-136.
- Dios-Diz MR-L, J.R. Martínez-Calvo, C. Rodríguez-Pérez, M. Melero-Brezo, J.R. García-Cepeda. (2003). Prevalencia de la incontinencia urinaria en personas mayores de 64 años en Galicia. 17, 409-411.
- Dixon JS, Jen PY, Yeung CK, Chow LT, Mathews R, Gearhart JP & Gosling JA. (1998). The structure and autonomic innervation of the vesico-ureteric junction in cases of primary ureteric reflux. *Br J Urol* 81, 146-151.

- Dmochowski RR. (2013). Elucidation of phosphodiesterase type 5 inhibitor mechanism of action. *J Urol* 190, 1161-1162.
- Dokita S, Smith SD, Nishimoto T, Wheeler MA & Weiss RM. (1994). Involvement of nitric oxide and cyclic GMP in rabbit urethral relaxation. *Eur J Pharmacol* 266, 269-275.
- Donoso MV, Salas C, Sepulveda G, Lewin J, Fournier A & Huidobro-Toro JP. (1994). Involvement of ETA receptors in the facilitation by endothelin-1 of non-adrenergic non-cholinergic transmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 111, 473-482.
- Dooley Y, Kenton K, Cao G, Luke A, Durazo-Arvizu R, Kramer H & Brubaker L. (2008). Urinary incontinence prevalence: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *J Urol* 179, 656-661.
- Drake MJ. (2007). The integrative physiology of the bladder. *Ann R Coll Surg Engl* 89, 580-585.
- Drake MJ, Harvey IJ & Gillespie JI. (2003). Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder. *Exp Physiol* 88, 19-30.
- Drake MJ, Mills IW & Gillespie JI. (2001). Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *Lancet* 358, 401-403.
- Drake RL, Vogl W & Mitchell AW. (2010). *Gray's - Anatomía para estudiantes*. (2ª Ed.). Barcelona: Elsevier.
- Dray A & Perkins M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 16, 99-104.
- Du S, Araki I, Mikami Y, Zakoji H, Beppu M, Yoshiyama M & Takeda M. (2007). Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked adenosine triphosphate release. *Urology* 69, 590-595.
- Dubos FL, Gendrel D, Breart G & Chalumeau M. (2007). Procalcitonin to reduce the number of unnecessary cystographies in children with a urinary tract infection: a European validation study. *J Pediatr* 150, 89-95.
- Duchene J & Ahluwalia A. (2009). The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 9, 125-131.
- Dugan E, Roberts CP, Cohen SJ, Preisser JS, Davis CC, Bland DR & Albertson E. (2001). Why older community-dwelling adults do not discuss urinary incontinence with their primary care physicians. *J Am Geriatr Soc* 49, 462-465.
- Dunning-Davies BM, Fry CH, Mansour D & Ferguson DR. (2013). The regulation of ATP release from the urothelium by adenosine and transepithelial potential. *BJU Int* 111, 505-513.
- Dymshitz J & Vasko MR. (1994). Endothelin-1 enhances capsaicin-induced peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons. *Neurosci Lett* 167, 128-132.
- E MA. (2005). Terminología de la función del tracto urinario inferior. 29, 5-7.
- Edyvane KA, Smet PJ, Trussell DC, Jonavicius J & Marshall VR. (1994). Patterns of neuronal colocalisation of tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, calcitonin gene-related peptide and substance P in human ureter. *J Auton Nerv Syst* 48, 241-255.

- Edyvane KA, Trussell DC, Jonavicius J, Henwood A & Marshall VR. (1992). Presence and regional variation in peptide-containing nerves in the human ureter. *J Auton Nerv Syst* 39, 127-137.
- Ehren I, Adolfsson J & Wiklund NP. (1994). Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urol Res* 22, 287-290.
- Ekholm D, Belfrage P, Manganiello V & Degerman E. (1997). Protein kinase A-dependent activation of PDE4 (cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase) in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1356, 64-70.
- Elliott RA & Castleden CM. (1993). Nerve mediated relaxation in human detrusor muscle. *Br J Clin Pharmacol* 36, 479; author reply 480-471.
- Erauso A, Perrouin-Verbe MA, Papin G, Volant A, Doucet L, Joulin V, Deruelle C, Rousseau B, Valeri A & Fournier G. (2012). [Urinary continence following laparoscopic radical prostatectomy: qualitative analysis]. *Prog Urol* 22, 945-953.
- Espino DV, Palmer RF, Miles TP, Mouton CP, Lichtenstein MJ & Markides KP. (2003). Prevalence and severity of urinary incontinence in elderly Mexican-American women. *J Am Geriatr Soc* 51, 1580-1586.
- Espuña Pons M. (2003). Incontinencia de orina en la mujer. *120*, 464-472.
- Esquena S, Millán Rodríguez F, Sánchez-Martín FM, Rousaud Barón F, Marchant F & Villavicencio Mavrich H. (2006). Cólico renal: Revisión de la literatura y evidencia científica. *Actas Urológicas Españolas* 30, 268-280.
- Fahrenkrug J & Hannibal J. (1998). PACAP in visceral afferent nerves supplying the rat digestive and urinary tracts. *Ann N Y Acad Sci* 865, 542-546.
- Farias NC, Feres T, Paiva AC & Paiva TB. (2005). Ca²⁺-dependent K⁺ channels are targets for bradykinin B1 receptor ligands and for lipopolysaccharide in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 525, 123-127.
- Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, Vaughan ED, Jr. & Poppas DP. (2003). Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol* 169, 1569-1572.
- Fernandes VS, Ribeiro AS, Barahona MV, Orensanz LM, Martínez-Sáenz A, Recio P, Martínez AC, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2013a). Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck: role of KATP channels, sensory nerves and calcium signaling. *J Urol* 190, 746-756.
- Fernandes VS, Ribeiro AS, Martínez MP, Orensanz LM, Barahona MV, Martínez-Sáenz A, Recio P, Benedito S, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2013b). Endogenous hydrogen sulfide has a powerful role in inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *J Urol* 189, 1567-1573.
- Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G & Wallace JL. (2006). The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131, 259-271.
- Forner S, Andrade EL, Martini AC, Bento AF, Medeiros R, Koepp J & Calixto JB. (2012). Effects of kinin B(1) and B(2) receptor antagonists on overactive urinary bladder syndrome induced by spinal cord injury in rats. *Br J Pharmacol* 167, 1737-1752.

- Foster P. (1998). Behavioral treatment of urinary incontinence: a complementary approach. *Ostomy Wound Manage* 44, 62-66, 68, 70.
- Fry CH, Wu C & Sui GP. (1998). Electrophysiological properties of the bladder. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 9, 291-298.
- Fujishige A, Takahashi K & Tsuchiya T. (2002). Altered mechanical properties in smooth muscle of mice with a mutated calponin locus. *Zoolog Sci* 19, 167-174.
- Fujita M, Hines CS, Zoghbi SS, Mallinger AG, Dickstein LP, Liow JS, Zhang Y, Pike VW, Drevets WC, Innis RB & Zarate CA, Jr. (2012). Downregulation of brain phosphodiesterase type IV measured with 11C-(R)-rolipram positron emission tomography in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 72, 548-554.
- Furst DO, Cross RA, De Mey J & Small JV. (1986). Caldesmon is an elongated, flexible molecule localized in the actomyosin domains of smooth muscle. *Embo j* 5, 251-257.
- Furukawa T. (2014). Types of Voltage-Gated Calcium Channels: Molecular and Electrophysiological View. *Curr Hypertens Rev*.
- Fusco F, di Villa Bianca R, Mitidieri E, Cirino G, Sorrentino R & Mirone V. (2012). Sildenafil effect on the human bladder involves the L-cysteine/hydrogen sulfide pathway: a novel mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Eur Urol* 62, 1174-1180.
- Game X, Rischmann P, Arnal JF & Malavaud B. (2013). [Nitric oxide pathway and female lower urinary tract. Physiological and pathophysiological role]. *Prog Urol* 23, 926-935.
- Gavalda A & Roberts RS. (2013). Phosphodiesterase-4 inhibitors: a review of current developments (2010 - 2012). *Expert Opin Ther Pat* 23, 997-1016.
- Gavras I. (1992). Bradykinin-mediated effects of ACE inhibition. *Kidney Int* 42, 1020-1029.
- Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W & Grimminger F. (2004). Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 44, 1488-1496.
- Giembycz MA & Maurice DH. (2014). Cyclic nucleotide-based therapeutics for chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pharmacol* 16c, 89-107.
- Giglio D, Delbro DS & Tobin G. (2001). On the functional role of muscarinic M2 receptors in cholinergic and purinergic responses in the rat urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 428, 357-364.
- Gillespie JI. (2005). Inhibitory actions of calcitonin gene-related peptide and capsaicin: evidence for local axonal reflexes in the bladder wall. *BJU Int* 95, 149-156.
- Girard BM, Malley SE & Vizzard MA. (2011). Neurotrophin/receptor expression in urinary bladder of mice with overexpression of NGF in urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F345-355.
- Girard BM, Tompkins JD, Parsons RL, May V & Vizzard MA. (2012). Effects of CYP-induced cystitis on PACAP/VIP and receptor expression in micturition pathways and bladder function in mice with overexpression of NGF in urothelium. *J Mol Neurosci* 48, 730-743.

- Girard BM, Wolf-Johnston A, Braas KM, Birdier LA, May V & Vizzard MA. (2008). PACAP-mediated ATP release from rat urothelium and regulation of PACAP/VIP and receptor mRNA in micturition pathways after cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. *J Mol Neurosci* 36, 310-320.
- Golenhofen K & Hannappel J. (1973). Normal spontaneous activity of the pyeloureteral system in the guinea-pig. *Pflugers Arch* 341, 257-270.
- Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV & Somlyo AP. (1997). Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 272, 10704-10709.
- González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D & Latorre R. (2012). K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol* 2, 2087-2149.
- Goodman Gilman A. (2003). *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. (10ª Ed.). McGraw-Hill..
- Gopalakrishnan M & Shieh CC. (2004). Potassium channel subtypes as molecular targets for overactive bladder and other urological disorders. *Expert Opin Ther Targets* 8, 437-458.
- Gosling JA, Gilpin SA, Dixon JS & Gilpin CJ. (1986). Decrease in the autonomic innervation of human detrusor muscle in outflow obstruction. *J Urol* 136, 501-504.
- Gosling JA, Kung LS, Dixon JS, Horan P, Whitbeck C & Levin RM. (2000). Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol* 163, 1349-1356.
- Gulur DM & Drake MJ. (2010). Management of overactive bladder. *Nat Rev Urol* 7, 572-582.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H & Wymore RS. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55, 583-586.
- Guyton C & Hall J. (2006). *Tratado de Fisiología*. (11ª Ed.). Elsevier.
- Habler HJ, Janig W & Koltzenburg M. (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 425, 545-562.
- Habler HJ, Janig W & Koltzenburg M. (1993). Myelinated primary afferents of the sacral spinal cord responding to slow filling and distension of the cat urinary bladder. *J Physiol* 463, 449-460.
- Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC & Birdier LA. (2007). Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80, 2298-2302.
- Hannestad YS, Rortveit G, Sandvik H & Hunskaar S. (2000). A community-based epidemiological survey of female urinary incontinence: the Norwegian EPINCONT study. Epidemiology of Incontinence in the County of Nord-Trøndelag. *J Clin Epidemiol* 53, 1150-1157.
- Harmar AJ. (2004). Clinical endocrinology and metabolism. Receptors for gut peptides. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18, 463-475.
- Harvey RA, Skennerton DE, Newgreen D & Fry CH. (2002). The contractile potency of adenosine triphosphate and ecto-adenosine triphosphatase activity in guinea pig detrusor and detrusor from patients with a stable, unstable or obstructed bladder. *J Urol* 168, 1235-1239.

- Hashim H & Abrams P. (2006). Pharmacological management of women with mixed urinary incontinence. *Drugs* 66, 591-606.
- Hashitani H, Bramich NJ & Hirst GD. (2000). Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 524 Pt 2, 565-579.
- Hashitani H, Fukuta H, Takano H, Klemm MF & Suzuki H. (2001). Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 530, 273-286.
- Hatzelmann A & Schudt C. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 267-279.
- Hawthorn MH, Chapple CR, Cock M & Chess-Williams R. (2000). Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol* 129, 416-419.
- Hegde SS. (2006). Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 2, S80-87.
- Heikaus CC, Pandit J & Klevit RE. (2009). Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure* 17, 1551-1557.
- Hernández M, Barahona MV, Bustamante S, García-Sacristán A & Orensanz LM. (1999). A2B adenosine receptors mediate relaxation of the pig intravesical ureter: adenosine modulation of non adrenergic non cholinergic excitatory neurotransmission. *Br J Pharmacol* 126, 969-978.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2006). PACAP 38 is involved in the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission in the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* 25, 490-497.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Navarro-Dorado J, Bustamante S, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2008). Role of neuronal voltage-gated K(+) channels in the modulation of the nitrergic neurotransmission of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 153, 1251-1258.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Rivera L, Benedito S, Martínez AC, García-Sacristán A, Orensanz LM & Prieto D. (2004). Heterogeneity of neuronal and smooth muscle receptors involved in the VIP- and PACAP-induced relaxations of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 141, 123-131.
- Hernández M & Bustamante S (2010). Bases Neuroanatómicas y Neurofisiológicas de la vejiga urinaria. *En* Salinas JC & Esteban MF (1ªEd.), *Compendio de la vejiga neurógena traumática*. (pp.17-49). Barcelona: Astra Tech SA.
- Hernández M, García-Sacristán A & Orensanz LM. (1995a). Muscarinic binding sites of the pig intravesical ureter. *J Auton Pharmacol* 15, 351-359.
- Hernández M, Knight GE, Wildman SS & Burnstock G. (2009). Role of ATP and related purines in inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 157, 1463-1473.
- Hernández M, Prieto D, Orensanz LM, Barahona MV, García-Sacristán A & Simonsen U. (1995b). Nitric oxide is involved in the non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission of the pig intravesical ureter. *Neurosci Lett* 186, 33-36.

- Hernández M, Prieto D, Orensanz LM, Barahona MV, Jiménez-Cidre M, Rivera L, García-Sacristán A & Simonsen U. (1997). Involvement of a glibenclamide-sensitive mechanism in the nitrergic neurotransmission of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 120, 609-616.
- Hernández M, Prieto D, Simonsen U, Rivera L, Barahona MV & García-Sacristán A. (1992). Noradrenaline modulates smooth muscle activity of the isolated intravesical ureter of the pig through different types of adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 107, 924-931.
- Hernández M, Recio P, Barahona MV, Bustamante S, Pena L, Martínez AC, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2007). Pre-junctional α_2 -adrenoceptors modulation of the nitrergic transmission in the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* 26, 578-583.
- Hernández M, Simonsen U, Prieto D, Rivera L, Garcia P, Ordaz E & García-Sacristán A. (1993). Different muscarinic receptor subtypes mediating the phasic activity and basal tone of pig isolated intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 110, 1413-1420.
- Herrera GM, Etherton B, Nausch B & Nelson MT. (2005). Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by K_{Ca} channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R402-r409.
- Herrera GM, Heppner TJ & Nelson MT. (2000). Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R60-68.
- Herrera GM & Nelson MT. (2002). Differential regulation of SK and BK channels by Ca²⁺ signals from Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol* 541, 483-492.
- Hille B. (1986). Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect* 82, 47-69.
- Hillmeister P & Persson PB. (2012). The Kallikrein-Kinin system. *Acta Physiol (Oxf)* 206, 215-219.
- Hirayama Y & Kayakiri H. (2002). [Bradykinin antagonist: current status and perspective]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 119, 45-53.
- Hofmann F, Ammendola A & Schlossmann J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113 (Pt 10), 1671-1676.
- Holdgate A & Oh CM. (2005). Is there a role for antimuscarinics in renal colic? A randomized controlled trial. *J Urol* 174, 572-575; discussion 575.
- Holdgate A & Pollock T. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) versus opioids for acute renal colic. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd004137.
- Holmgren C, Nilsson S, Lanner L & Hellberg D. (2005). Long-term results with tension-free vaginal tape on mixed and stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 106, 38-43.
- Hotta S, Morimura K, Ohya S, Muraki K, Takeshima H & Imaizumi Y. (2007). Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* 582, 489-506.
- Houslay MD & Adams DR. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 370, 1-18.

- Hristov KL, Chen M, Kellett WF, Rovner ES & Petkov GV. (2011). Large-conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels regulate human detrusor smooth muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C903-912.
- Hua XY & Lundberg JM. (1986). Dual capsaicin effects on ureteric motility: low dose inhibition mediated by calcitonin gene-related peptide and high dose stimulation by tachykinins? *Acta Physiol Scand* 128, 453-465.
- Huang AJ, Thom DH, Kanaya AM, Wassel-Fyr CL, Van den Eeden SK, Ragins AI, Subak LL & Brown JS. (2006). Urinary incontinence and pelvic floor dysfunction in Asian-American women. *Am J Obstet Gynecol* 195, 1331-1337.
- Huang SA & Lie JD. (2013). Phosphodiesterase-5 (PDE) Inhibitors In the Management of Erectile Dysfunction. *P t* 38, 407-419.
- Hubner WA, Irby P & Stoller ML. (1993). Natural history and current concepts for the treatment of small ureteral calculi. *Eur Urol* 24, 172-176.
- Hudman D, Elliott RA & Norman RI. (2000). $\text{K}(\text{ATP})$ channels mediate the $\beta(2)$ -adrenoceptor agonist-induced relaxation of rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* 397, 169-176.
- Hunikaar S, Lose G, Sykes D & Voss S. (2004). The prevalence of urinary incontinence in women in four European countries. *BJU Int* 93, 324-330.
- Hutchison A, Farmer R, Verhamme K, Berges R & Navarrete RV. (2007). The efficacy of drugs for the treatment of LUTS/BPH, a study in 6 European countries. *Eur Urol* 51, 207-215; discussion 215-206.
- Iacovou JW, Hill SJ & Birmingham AT. (1990). Agonist-induced contraction and accumulation of inositol phosphates in the guinea-pig detrusor: evidence that muscarinic and purinergic receptors raise intracellular calcium by different mechanisms. *J Urol* 144, 775-779.
- Ichikawa S & Ikeda O. (1960). Recovery curve and conduction of action potentials in the ureter of the guinea-pig. *Jpn J Physiol* 10, 1-12.
- Igawa Y, Yamazaki Y, Takeda H, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Yoneyama T, Nishizawa O & Andersson KE. (1999). Functional and molecular biological evidence for a possible $\beta(3)$ -adrenoceptor in the human detrusor muscle. *Br J Pharmacol* 126, 819-825.
- Igawa Y, Yamazaki Y, Takeda H, Kaidoh K, Akahane M, Ajisawa Y, Yoneyama T, Nishizawa O & Andersson KE. (2001). Relaxant effects of isoproterenol and selective $\beta(3)$ -adrenoceptor agonists on normal, low compliant and hyperreflexic human bladders. *J Urol* 165, 240-244.
- Ikeda Y, Fry C, Hayashi F, Stolz D, Griffiths D & Kanai A. (2007). Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1018-1025.
- Imai T, Tanaka Y, Okamoto T, Yamamoto Y, Horinouchi T, Tanaka H, Koike K & Shigenobu K. (2002). Evidence that action potential generation is not the exclusive determinant to trigger spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 176, 57-63.
- Imaizumi Y, Muraki K & Watanabe M. (1990). Characteristics of transient outward currents in single smooth muscle cells from the ureter of the guinea-pig. *J Physiol* 427, 301-324.

- Imaizumi Y, Torii Y, Ohi Y, Nagano N, Atsuki K, Yamamura H, Muraki K, Watanabe M & Bolton TB. (1998). Ca^{2+} images and K^{+} current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol* 510 (Pt 3), 705-719.
- James MJ, Birmingham AT & Hill SJ. (1993). Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical field stimulation. *Br J Clin Pharmacol* 35, 366-372.
- Jefferies M, Cox A, Bennett A & Kynaston H. (2013). Management of lower urinary tract symptoms in men. *Br J Hosp Med (Lond)* 74, 518-522.
- Jezior JR, Brady JD, Rosenstein DI, McCammon KA, Miner AS & Ratz PH. (2001). Dependency of detrusor contractions on calcium sensitization and calcium entry through LOE-908-sensitive channels. *Br J Pharmacol* 134, 78-87.
- Ji G, Barsotti RJ, Feldman ME & Kotlikoff ML. (2002). Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *J Gen Physiol* 119, 533-544.
- Johansson RK, Poljakovic M, Andersson KE & Persson K. (2002). Expression of nitric oxide synthase in bladder smooth muscle cells: regulation by cytokines and L-arginine. *J Urol* 168, 2280-2285.
- John H, Hauri D, Bangerter U & Elbadawi A. (2001). Ultrastructure of the trigone and its functional implications. *Urol Int* 67, 264-271.
- Jones JB. (2001). Pathophysiology of acute pain: implications for clinical management. *Emerg Med (Fremantle)* 13, 288-292.
- Jones JB & Dula DJ. (1998). The efficacy of sublingual hyoscyamine sulfate and intravenous ketorolac tromethamine in the relief of ureteral colic. *Am J Emerg Med* 16, 557-559.
- Kanai A & Andersson KE. (2010). Bladder afferent signaling: recent findings. *J Urol* 183, 1288-1295.
- Kaplan AP, Joseph K & Silverberg M. (2002). Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 109, 195-209.
- Karicheti V & Christ GJ. (2001). Physiological roles for K^{+} channels and gap junctions in urogenital smooth muscle: implications for improved understanding of urogenital function, disease and therapy. *Curr Drug Targets* 2, 1-20.
- Kasri NN, Holmes AM, Bultynck G, Parys JB, Bootman MD, Rietdorf K, Missiaen L, McDonald F, De Smedt H, Conway SJ, Holmes AB, Berridge MJ & Roderick HL. (2004). Regulation of InsP_3 receptor activity by neuronal Ca^{2+} -binding proteins. *Embo j* 23, 312-321.
- Kawasaki H, Nuki C, Saito A & Takasaki K. (1990). Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 403-409.
- Ke H, Wang H & Ye M. (2011). Structural insight into the substrate specificity of phosphodiesterases. *Handb Exp Pharmacol*, 121-134.
- Kedia GT, Uckert S, Kedia M & Kuczyk MA. (2009). Effects of phosphodiesterase inhibitors on contraction induced by endothelin-1 of isolated human prostatic tissue. *Urology* 73, 1397-1401.

- Khan MA, Dashwood MR, Thompson CS, Mumtaz FH, Mikhailidis DP & Morgan RJ. (1999). Up-regulation of endothelin (ET(A) and ET(B)) receptors and down-regulation of nitric oxide synthase in the detrusor of a rabbit model of partial bladder outlet obstruction. *Urol Res* 27, 445-453.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A & Kaibuchi K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kinder RB & Mundy AR. (1987). Pathophysiology of idiopathic detrusor instability and detrusor hyper-reflexia. An in vitro study of human detrusor muscle. *Br J Urol* 60, 509-515.
- Kinder RB, Restorick JM & Mundy AR. (1985). Vasoactive intestinal polypeptide in the hyper-reflexic neuropathic bladder. *Br J Urol* 57, 289-291.
- Klahr S. (1991). New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 18, 689-699.
- Knight GE, Bodin P, De Groat WC & Burnstock G. (2002). ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F281-288.
- Ko EA, Han J, Jung ID & Park WS. (2008). Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44, 65-81.
- Kolluru GK, Shen X, Bir SC & Kevil CG. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35, 5-20.
- Kotlikoff ML, Wang YX, Xin HB & Ji G. (2002). Calcium release by ryanodine receptors in smooth muscle. *Novartis Found Symp* 246, 108-119; discussion 119-124, 221-107.
- Krichevsky VP, Pagala MK, Vaydovsky I, Damer V & Wise GJ. (1999). Function of M3 muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol* 161, 1644-1650.
- Kubo T & Kawamura S. (1992). Anatomy and function of the upper urinary tract. *The Japanese journal of urology* 83, 1759-1766.
- Kuhn R, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Lietz B, Bischoff E, Schramm M & Jonas U. (2000). Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res* 28, 110-115.
- Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V & Skidgel RA. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44, 145-154.
- Kullmann FA, Limberg BJ, Artim DE, Shah M, Downs TR, Contract D, Wos J, Rosenbaum JS & de Groat WC. (2009). Effects of beta3-adrenergic receptor activation on rat urinary bladder hyperactivity induced by ovariectomy. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 704-717.
- Kumar V, Chapple CC & Chess-Williams R. (2004). Characteristics of adenosine triphosphate [corrected] release from porcine and human normal bladder. *J Urol* 172, 744-747.
- Kurizaki Y, Ishizuka O, Imamura T, Ichino M, Ogawa T, Igawa Y, Nishizawa O & Andersson KE. (2011). Relation between expression of alpha(1)-adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. *Scand J Urol Nephrol* 45, 15-19.

- LaBerge J, Malley SE, Zvarova K & Vizzard MA. (2006). Expression of corticotropin-releasing factor and CRF receptors in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R692-703.
- Labrecque M, Dostaler LP, Rousselle R, Nguyen T & Poirier S. (1994). Efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of acute renal colic. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 154, 1381-1387.
- Laburthe M, Couvineau A & Marie JC. (2002). VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* 8, 137-153.
- Lang RJ, Davidson ME & Exintaris B. (2002). Pyeloureteral motility and ureteral peristalsis: essential role of sensory nerves and endogenous prostaglandins. *Exp Physiol* 87, 129-146.
- Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Parkington HC & Suzuki H. (2007). Spontaneous electrical and Ca²⁺ signals in typical and atypical smooth muscle cells and interstitial cell of Cajal-like cells of mouse renal pelvis. *J Physiol* 583, 1049-1068.
- Lang RJ, Tonta MA, Zoltowski BZ, Meeker WF, Wendt I & Parkington HC. (2006). Pyeloureteric peristalsis: role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers. *J Physiol* 576, 695-705.
- Lang RJ & Zhang Y. (1996). The effects of K⁺ channel blockers on the spontaneous electrical and contractile activity in the proximal renal pelvis of the guinea pig. *J Urol* 155, 332-336.
- Lanzone JA, Gulmi FA, Chou SY, Mooppan UM & Kim H. (1995). Renal hemodynamics in acute unilateral ureteral obstruction: contribution of endothelium-derived relaxing factor. *J Urol* 153, 2055-2059.
- Large WA. (2002). Receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13, 493-501.
- Latifpour J, Kondo S, O'Hollaren B, Morita T & Weiss RM. (1990). Autonomic receptors in urinary tract: sex and age differences. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 661-667.
- Lazzetti G & Rigutti E. (2005). *Atlas of Anatomy*. (Group Ed. Reimpresa).
- Lecci A & Maggi CA. (2001). Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept* 101, 1-18.
- Lecci A & Maggi CA. (2003). Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets* 7, 343-362.
- Lecci A, Meini S, Tramontana M, Giuliani S, Criscuoli M & Maggi CA. (1999). Kinin B1 receptor-mediated motor responses in normal or inflamed rat urinary bladder in vivo. *Regul Pept* 80, 41-47.
- Lee HY, Bardini M & Burnstock G. (2000). Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol* 163, 2002-2007.
- Lee SW, Wang HZ, Zhao W, Ney P, Brink PR & Christ GJ. (1999). Prostaglandin E1 activates the large-conductance KCa channel in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res* 11, 189-199.

- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ & Zuraw BL. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57, 27-77.
- Lemack GE, Zimmern PE, Vazquez D, Connell JD & Lin VK. (2000). Altered response to partial bladder outlet obstruction in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Urol* 163, 1981-1987.
- Leone Roberti Maggiore U, Cardozo L, Ferrero S, Sileo F, Cola A, Torella M, Colacurci N, Candiani M & Salvatore S. (2014). Mirabegron in the treatment of overactive bladder. *Expert Opin Pharmacother* 15, 873-887.
- Leroy S, Romanello C, Galetto-Lacour A, Smolkin V, Korczowski B, Rodrigo C, Tuerlinckx D, Gajdos V, Moulin F, Contardo M, Gervaix A, Halevy R, Duhl B, Prat C, Borghet TV, Foix-l'Hélias
- Lewis SA. (2000). Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F867-874.
- Li M, Chang TH, Silberberg SD & Swartz KJ. (2008). Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11, 883-887.
- Lin CS, Albersen M, Xin Z, Namiki M, Muller D & Lue TF. (2013). Phosphodiesterase-5 expression and function in the lower urinary tract: a critical review. *Urology* 81, 480-487.
- Linz W, Wiemer G & Scholkens BA. (1992). ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 24, 909-919.
- Litjens T, Nguyen T, Castro J, Aromataris EC, Jones L, Barritt GJ & Rychkov GY. (2007). Phospholipase C-gamma1 is required for the activation of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells. *Biochem J* 405, 269-276.
- Ljunghall S, Danielson BG, Fellstrom B, Holmgren K, Johansson G & Wikstrom B. (1985). Family history of renal stones in recurrent stone patients. *Br J Urol* 57, 370-374.
- Loiola RA, Reis FC, Kawamoto EM, Scavone C, Abdalla DS, Fernandes L & Pesquero JB. (2011). Role of vascular Kinin B1 and B2 receptors in endothelial nitric oxide metabolism. *Peptides* 32, 1700-1705.
- Longhurst PA, Briscoe JA, Rosenberg DJ & Leggett RE. (1997). The role of cyclic nucleotides in guinea-pig bladder contractility. *Br J Pharmacol* 121, 1665-1672.
- Longhurst PA & Levendusky M. (1999). Pharmacological characterization of beta-adrenoceptors mediating relaxation of the rat urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol* 127, 1744-1750.
- Longrigg N. (1974). Autonomic innervation of the renal calyx. *Br J Urol* 46, 357-370.
- Lowry PS, Jerde TJ, Bjorling DE, Maskel JL & Nakada SY. (2005). Obstruction alters the effect of prostaglandin E2 on ureteral contractility. *J Endourol* 19, 183-187.
- Luber KM, Boero S & Choe JY. (2001). The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections. *Am J Obstet Gynecol* 184, 1496-1501; discussion 1501-1493.
- Madeddu P. (1993). Receptor antagonists of bradykinin: a new tool to study the cardiovascular effects of endogenous kinins. *Pharmacol Res* 28, 107-128.
- Maggi CA, Giuliani S, Meini S & Santicioli P. (1995). Calcitonin gene related peptide as inhibitory neurotransmitter in the ureter. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 986-990.

- Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Turini D, Barbanti G, Giachetti A & Meli A. (1989). Multiple sources of calcium for contraction of the human urinary bladder muscle. *Br J Pharmacol* 98, 1021-1031.
- Mak DO, McBride S & Foskett JK. (2001). Regulation by Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) of single recombinant type 3 InsP3 receptor channels. Ca^{2+} activation uniquely distinguishes types 1 and 3 insp3 receptors. *J Gen Physiol* 117, 435-446.
- Malin JM, Jr., Deane RF & Boyarsky S. (1970). Characterisation of adrenergic receptors in human ureter. *Br J Urol* 42, 171-174.
- Manning DC & Snyder SH. (1989). Bradykinin receptors localized by quantitative autoradiography in kidney, ureter, and bladder. *Am J Physiol* 256, F909-915.
- Marketou ME & Vardas PE. (2012). Bradykinin in the treatment of arterial hypertension: friend or foe? *Hellenic J Cardiol* 53, 91-94.
- Martínez-Sáenz A, Recio P, Orensanz LM, Fernandes VS, Martínez MP, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2011). Role of calcitonin gene-related peptide in inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *J Urol* 186, 728-735.
- Masters JG, Neal DE & Gillespie JL. (1999). The contribution of intracellular Ca^{2+} release to contraction in human bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 127, 996-1002.
- Mastrangelo D, Baertschi AJ, Roatti A, Amherdt M & Iselin CE. (2003). Nitric oxide production within rat urothelial cells. *J Urol* 170, 1409-1414.
- Mastrangelo D, Wisard M, Rohner S, Leisinger H & Iselin CE. (2000). Diclofenac and NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, decrease agonist-induced contractions of the pig isolated ureter. *Urol Res* 28, 376-382.
- Masuda H, Okuno T, Suzuki M, Kihara K, Goto M & Azuma H. (2002). Different distribution of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase activities in the detrusor and proximal urethra of the rabbit. *J Urol* 168, 2286-2290.
- Masunaga K, Chapple CR, McKay NG, Yoshida M & Sellers DJ. (2010). The beta3-adrenoceptor mediates the inhibitory effects of beta-adrenoceptor agonists via the urothelium in pig bladder dome. *Neurourol Urodyn* 29, 1320-1325.
- Matsumoto T, Kobayashi T & Kamata K. (2003). Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res* 39, 67-86.
- Matsumoto-Miyai K, Kagase A, Yamada E, Yoshizumi M, Murakami M, Ohba T & Kawatani M. (2011). Store-operated Ca^{2+} entry suppresses distention-induced ATP release from the urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F716-720.
- Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, Howarth P, Kaplan A, Kojda G, Leeb-Lundberg F, Lotvall J & Magerl M. (2011). New topics in bradykinin research. *Allergy* 66, 1397-1406.
- May V & Vizzard MA. (2010). Bladder dysfunction and altered somatic sensitivity in PACAP-/- mice. *J Urol* 183, 772-779.
- McCloskey KD. (2011). Interstitial cells of Cajal in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*, 233-254.

- McCloskey KD & Gurney AM. (2002). Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol* 168, 832-836.
- McFadzean I & Gibson A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 135, 1-13.
- McLeod DG, Reynolds DG & Swan KG. (1973). Adrenergic mechanisms in the canine ureter. *Am J Physiol* 224, 1054-1058.
- Meini S, Cucchi P, Catalani C, Bellucci F, Santicoli P, Giuliani S & Maggi CA. (2010). Radioligand binding characterization of the bradykinin B(2) receptor in the rabbit and pig ileal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 635, 34-39.
- Metzger R, Schuster T, Till H, Franke FE & Dietz HG. (2005). Cajal-like cells in the upper urinary tract: comparative study in various species. *Pediatr Surg Int* 21, 169-174.
- Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE & Dietz HG. (2004). Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* 172, 769-772.
- Michel MC. (2011). beta-Adrenergic Receptor Subtypes in the Urinary Tract. *Handb Exp Pharmacol*, 307-318.
- Michel MC & Vrydag W. (2006). Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 2, S88-119.
- Miller MS. (2013). Role of phosphodiesterase type 5 inhibitors for lower urinary tract symptoms. *Ann Pharmacother* 47, 278-283.
- Miller OF & Kane CJ. (1999). Time to stone passage for observed ureteral calculi: a guide for patient education. *J Urol* 162, 688-690; discussion 690-681.
- Minassian VA, Stewart WF & Wood GC. (2008). Urinary incontinence in women: variation in prevalence estimates and risk factors. *Obstet Gynecol* 111, 324-331.
- Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T & Iino M. (2001). Ca(2+)-sensor region of IP(3) receptor controls intracellular Ca(2+) signaling. *Embo j* 20, 1674-1680.
- Miyatake R, Tomiyama Y, Murakami M, Park YC & Kurita T. (2001). Effects of isoproterenol and butylscopolamine on the friction between an artificial stone and the intraureteral wall in anesthetized rabbits. *J Urol* 166, 1083-1087.
- Montgomery BS & Fry CH. (1992). The action potential and net membrane currents in isolated human detrusor smooth muscle cells. *J Urol* 147, 176-184.
- Moody TE, Vaughn ED, Jr. & Gillenwater JY. (1975). Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral urethral occlusion. Implications for changing sites of increased renal resistance. *Invest Urol* 13, 246-251.
- Moore KH, Ray FR & Barden JA. (2001). Loss of purinergic P2X(3) and P2X(5) receptor innervation in human detrusor from adults with urge incontinence. *J Neurosci* 21, Rc166.
- Moore PK, Bhatia M & Moolchala S. (2003). Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 24, 609-611.

- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F & Adam A. (2005). The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99, 6-38.
- Morita T, Iizuka H, Iwata T & Kondo S. (2000). Function and distribution of beta3-adrenoceptors in rat, rabbit and human urinary bladder and external urethral sphincter. *J Smooth Muscle Res* 36, 21-32.
- Morita T, Ishizuka G & Tsuchida S. (1981). Initiation and propagation of stimulus from the renal pelvic pacemaker in pig kidney. *Invest Urol* 19, 157-160.
- Morita T, Tsujii T & Dokita S. (1992). Regional difference in functional roles of cAMP and cGMP in lower urinary tract smooth muscle contractility. *Urol Int* 49, 191-195.
- Moro C, Tajouri L & Chess-Williams R. (2013). Adrenoceptor function and expression in bladder urothelium and lamina propria. *Urology* 81, 211.e211-217.
- Mumtaz FH, Khan MA, Sullivan ME, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ & Dashwood MR. (1999). Potential role of endothelin and nitric oxide in physiology and pathophysiology of the lower urinary tract. *Endothelium* 7, 1-9.
- Murakami M, Tomiyama Y, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Park YC, Ohnishi N, Sugiyama T & Kurita T. (2000). Effects of beta-adrenergic stimulation on the acutely obstructed ureter in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 67-75.
- Murray E, Malley SE, Qiao LY, Hu VY & Vizzard MA. (2004). Cyclophosphamide induced cystitis alters neurotrophin and receptor tyrosine kinase expression in pelvic ganglia and bladder. *J Urol* 172, 2434-2439.
- Nakada SY, Jerde TJ, Bjorling DE & Saban R. (2001). In vitro contractile effects of neurokinin receptor blockade in the human ureter. *J Urol* 166, 1534-1538.
- Nakada SY, Jerde TJ, Jacobson LM, Saban R, Bjorling DE & Hullett DA. (2002). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in obstructed human ureter. *J Urol* 168, 1226-1229.
- Nakahira Y, Hashitani H, Fukuta H, Sasaki S, Kohri K & Suzuki H. (2001). Effects of isoproterenol on spontaneous excitations in detrusor smooth muscle cells of the guinea pig. *J Urol* 166, 335-340.
- Nakamura T, Kimura J & Yamaguchi O. (2002). Muscarinic M2 receptors inhibit Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat bladder smooth muscle. *Int J Urol* 9, 689-696.
- Nakanishi K, Kamai T, Mizuno T, Arai K & Yamanishi T. (2009). Expression of RhoA mRNA and activated RhoA in urothelium and smooth muscle, and effects of a Rho-kinase inhibitor on contraction of the porcine urinary bladder. *Neurourol Urodyn* 28, 521-528.
- Nieto B. E. C, P. J., Davila, A., V, Ledo Garcia, M. P., Moriano, B. P., Perez, L. M. (2003). Epidemiología e impacto de la incontinencia urinaria en mujeres de 40 a 65 años de edad en un área sanitaria de Madrid. *32*, 410-414.
- Nomiya M & Yamaguchi O. (2003). A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta-adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. *J Urol* 170, 649-653.
- Norregaard R, Jensen BL, Topcu SO, Nielsen SS, Walter S, Djurhuus JC & Frokiaer J. (2006). Cyclooxygenase type 2 is increased in obstructed rat and human ureter and contributes to pelvic pressure increase after obstruction. *Kidney Int* 70, 872-881.

- North AJ, Gimona M, Cross RA & Small JV. (1994). Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 3), 437-444.
- Notley RG. (1970). The musculature of the human ureter. *Br J Urol* 42, 724-727.
- Nunn DL & Taylor CW. (1992). Luminal Ca^{2+} increases the sensitivity of Ca^{2+} stores to inositol 1,4,5-trisphosphate. *Mol Pharmacol* 41, 115-119.
- O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AP, Popert R & McMahon SB. (2001). A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int* 87, 617-622.
- Ochodnický P, Michel MB, Butter JJ, Seth J, Panicker JN & Michel MC. (2013a). Bradykinin modulates spontaneous nerve growth factor production and stretch-induced ATP release in human urothelium. *Pharmacol Res* 70, 147-154.
- Ochodnický P, Uvelius B, Andersson KE & Michel MC. (2013b). Autonomic nervous control of the urinary bladder. *Acta Physiol (Oxf)* 207, 16-33.
- Ohya S, Tanaka M, Watanabe M & Maizumi Y. (2000). Diverse expression of delayed rectifier K^{+} channel subtype transcripts in several types of smooth muscles of the rat. *J Smooth Muscle Res* 36, 101-115.
- Okamoto H, Prestwich SA, Asai S, Unno T, Bolton TB & Komori S. (2002). Muscarinic agonist potencies at three different effector systems linked to the $\text{M}(2)$ or $\text{M}(3)$ receptor in longitudinal smooth muscle of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 135, 1765-1775.
- Omori K & Kotera J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100, 309-327.
- Otsuka A, Shinbo H, Matsumoto R, Kurita Y & Ozono S. (2008). Expression and functional role of beta-adrenoceptors in the human urinary bladder urothelium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377, 473-481.
- Pages L, Gavalda A & Lehner MD. (2009). PDE4 inhibitors: a review of current developments (2005 - 2009). *Expert Opin Ther Pat* 19, 1501-1519.
- Park HJ, Won JE, Sorsaburu S, Rivera PD & Lee SW. (2013). Urinary Tract Symptoms (LUTS) Secondary to Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and LUTS/BPH with Erectile Dysfunction in Asian Men: A Systematic Review Focusing on Tadalafil. *World J Mens Health* 31, 193-207.
- Park YC, Tomiyama Y, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Miyatake R, Kiwamoto H, Sugiyama T & Kurita T. (2000). Existence of a β_3 -adrenoceptor and its functional role in the human ureter. *J Urol* 164, 1364-1370.
- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S & Maggi CA. (2005). Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H_2S) contractile activity in rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* 509, 171-177.
- Pellacani A, Brunner HR & Nussberger J. (1992). Antagonizing and measurement: approaches to understanding of hemodynamic effects of kinins. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 9, S28-34.
- Perlberg S & Caine M. (1982). Adrenergic response of bladder muscle in prostatic obstruction. Its relation to detrusor instability. *Urology* 20, 524-527.
- Persson K, Garcia-Pascual A & Andersson KE. (1991). Difference in the actions of calcitonin gene-related peptide on pig detrusor and vesical arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 143, 45-53.

Peters CA, Skoog SJ, Arant BS, Jr., Copp HL, Elder JS, Hudson RG, Khoury AE, Lorenzo AJ, Pohl HG, Shapiro E, Snodgrass WT & Diaz M. (2010). Summary of the AUA Guideline on Management of Primary Vesicoureteral Reflux in Children. *J Urol* 184, 1134-1144.

Petkov GV. (2012). Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol* 9, 30-40.

Petkov GV, Heppner TJ, Bonev AD, Herrera GM & Nelson MT. (2001). Low levels of K(ATP) channel activation decrease excitability and contractility of urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1427-1433.

Petros PE & Woodman PJ. (2008). The Integral Theory of continence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19, 35-40.

Pfitzer G, Hofmann F, DiSalvo J & Ruegg JC. (1984). cGMP and cAMP inhibit tension development in skinned coronary arteries. *Pflugers Arch* 401, 277-280.

Piper AS & Large WA. (2003). Multiple conductance states of single Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol* 547, 181-196.

Prieto Chaparro L, Romero Maroto J & López López C. (2002). Conocimientos actualizados sobre fisiopatología de la obstrucción de la unión pielouretral. *Clínicas urológicas de la Complutense*, ISSN 1133-0414, N° 9, 2002, págs 13-28.

Prieto D, Simonsen U, Martín J, Hernández M, Rivera L, Lema L, García P & García-Sacristán A. (1994). Histochemical and functional evidence for a cholinergic innervation of the equine ureter. *J Auton Nerv Syst* 47, 159-170.

Putney JW. (2011). Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 980-984.

Rahnama'i MS, Uckert S, Hohnen R & van Koeveringe GA. (2013a). The role of phosphodiesterases in bladder pathophysiology. *Nat Rev Urol* 10, 414-424.

Rahnama'i MS, Van Koeveringe GA & Van Kerrebroeck PE. (2013b). Overactive bladder syndrome and the potential role of prostaglandins and phosphodiesterases: an introduction. *Nephrourol Mon* 5, 934-945.

Rebecchi MJ & Pentyala SN. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80, 1291-1335.

Recio P, Barahona MV, Orensanz LM, Bustamante S, Martínez AC, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2009). 5-hydroxytryptamine induced relaxation in the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 157, 271-280.

Regoli D & Barabe J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32, 1-46.

Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A & Gobeil FJ. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348, 1-10.

Restorick JM & Mundy AR. (1989). The density of cholinergic and alpha and beta adrenergic receptors in the normal and hyper-reflexic human detrusor. *Br J Urol* 63, 32-35.

Reubi JC. (2000). In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 921, 1-25.

- Ribeiro AS, Fernandes VS, Martínez-Sáenz A, Martínez P, Barahona MV, Orensanz LM, Blaha I, Serrano-Margüello D, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2014). Powerful relaxation of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram in the pig and human bladder neck. *J Sex Med* 11, 930-941.
- Ribeiro AS, Fernandes VS, Martínez MP, Martínez-Sáenz A, Pazos MR, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2013). Neuronal and Non-Neuronal Bradykinin Receptors Are Involved in the Contraction and/or Relaxation to the Pig Bladder Neck Smooth Muscle. *Neurourol Urodyn* 33, 558-65.
- Richardson CD, Donatucci CF, Page SO, Wilson KH & Schwinn DA. (1997). Pharmacology of tamsulosin: saturation-binding isotherms and competition analysis using cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Prostate* 33, 55-59.
- Riyach O, Ahsaini M, Kharbach Y, Bounoual M, Tazi MF, El Ammari JE, Mellas S, Fassi Mel J, Khallouk A & Farih MH. (2014). Bilateral ureteral obstruction revealing a benign prostatic hypertrophy: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 8, 42.
- Robinson D & Cardozo L. (2010). New drug treatments for urinary incontinence. *Maturitas* 65, 340-347.
- Rohner TJ, Hannigan JD & Sanford EJ. (1978). Altered in vitro adrenergic responses of dog detrusor muscle after chronic bladder outlet obstruction. *Urology* 11, 357-361.
- Rong W & Burnstock G. (2004). Activation of ureter nociceptors by exogenous and endogenous ATP in guinea pig. *Neuropharmacology* 47, 1093-1101.
- Rose JG & Gillenwater JY. (1974). The effect of adrenergic and cholinergic agents and their blockers upon ureteral activity. *Invest Urol* 11, 439-451.
- Saban MR, Sferra TJ, Davis CA, Simpson C, Allen A, Maier J, Fowler B, Knowlton N, Birder L, Wu XR & Saban R. (2010). Neuropilin-VEGF signaling pathway acts as a key modulator of vascular, lymphatic, and inflammatory cell responses of the bladder to intravesical BCG treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F1245-1256.
- Sadananda P, Vahabi B & Drake MJ. (2011). Bladder outlet physiology in the context of lower urinary tract dysfunction. *Neurourol Urodyn* 30, 708-713.
- Safarinejad MR. (2003). Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in a population-based study in Iran. *Int J Impot Res* 15, 246-252.
- Sairam K, Kulinskaya E, McNicholas TA, Boustead GB & Hanbury DC. (2002). Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 90, 836-839.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K & Masaki T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732-735.
- Sand C & Michel MC. (2014). Bradykinin contracts rat urinary bladder largely independently of phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 348, 25-31.
- Santicioli P, Carganico G, Meini S, Giuliani S, Giachetti A & Maggi CA. (1995). Modulation by stereoselective inhibition of cyclo-oxygenase of electromechanical coupling in the guinea-pig isolated renal pelvis. *Br J Pharmacol* 114, 1149-1158.

- Santicioli P & Maggi CA. (1998). Myogenic and neurogenic factors in the control of pyeloureteral motility and ureteral peristalsis. *Pharmacol Rev* 50, 683-722.
- Sanz MJ, Cortijo J & Morcillo EJ. (2005). PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol Ther* 106, 269-297.
- Sanz MJ, Cortijo J, Taha MA, Cerda-Nicolas M, Schatton E, Burgbacher B, Klar J, Tenor H, Schudt C, Issekutz AC, Hatzelmann A & Morcillo EJ. (2007). Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. *Br J Pharmacol* 152, 481-492.
- Sargent MA. (2000). What is the normal prevalence of vesicoureteral reflux? *Pediatr Radiol* 30, 587-593.
- Sarmina I, Spirnak JP & Resnick MI. (1987). Urinary lithiasis in the black population: an epidemiological study and review of the literature. *J Urol* 138, 14-17.
- Sasamura T & Kuraishi Y. (1999). Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. *Jpn J Pharmacol* 80, 275-280.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P & Loirand G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275, 21722-21729.
- Sawutz DG, Salvino JM, Seoane PR, Douty BD, Houck WT, Bobko MA, Doleman MS, Dolle RE & Wolfe HR. (1994). Synthesis, characterization, and conformational analysis of the D/L-Tic7 stereoisomers of the bradykinin receptor antagonist D-Arg0[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]bradykinin. *Biochemistry* 33, 2373-2379.
- Schaeffer P, Laplace MC, Savi P, Prabonnaud V, Salel V & Herbert JM. (2001). Detection of bradykinin B1 receptors in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 61, 291-298.
- Schlemper V, Medeiros R, Ferreira J, Campos MM & Calixto JB. (2005). Mechanisms underlying the relaxation response induced by bradykinin in the epithelium-intact guinea-pig trachea in vitro. *Br J Pharmacol* 145, 740-750.
- Schneider T, Fetscher C, Krege S & Michel MC. (2004a). Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 1148-1153.
- Schneider T, Hein P & Michel MC. (2004b). Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca²⁺ sources. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 47-53.
- Schulman CC. (1974). Electron microscopy of the human ureteric innervation. *Br J Urol* 46, 609-623.
- Shabir S, Cross W, Kirkwood LA, Pearson JF, Appleby PA, Walker D, Eardley I & Southgate J. (2013). Functional expression of purinergic P2 receptors and transient receptor potential channels by the human urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, F396-406.
- Sherwood NM, Krueckl SL & McRory JE. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 21, 619-670.

- Shibuya N & Kimura H. (2013). Production of hydrogen sulfide from d-cysteine and its therapeutic potential. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 87.
- Shmygol A & Wray S. (2005). Modulation of agonist-induced Ca^{2+} release by SR Ca^{2+} load: direct SR and cytosolic Ca^{2+} measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium* 37, 215-223.
- Shokeir AA. (2001). Renal colic: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Eur Urol* 39, 241-249.
- Shokeir AA. (2002). Renal colic: new concepts related to pathophysiology, diagnosis and treatment. *Curr Opin Urol* 12, 263-269.
- Sigala S, Dellabella M, Milanese G, Fornari S, Faccoli S, Palazzolo F, Peroni A, Mirabella G, Cunico SC, Spano P & Muzzonigro G. (2005). Evidence for the presence of $\alpha 1$ adrenoceptor subtypes in the human ureter. *Neurourol Urodyn* 24, 142-148.
- Sigala S, Mirabella G, Peroni A, Pezzotti G, Simeone C, Spano P & Cunico SC. (2002). Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology* 60, 719-725.
- Sjostrom S, Sillen U, Bachelard M, Hansson S & Stokland E. (2004). Spontaneous resolution of high grade infantile vesicoureteral reflux. *J Urol* 172, 694-698; discussion 699.
- Smally AJ. (1997). Analgesia in renal colic. In *Ann Emerg Med*, pp. 296; author reply 297-299. United states.
- Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR & de Vente J. (1996). Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience* 71, 337-348.
- Smirnov SV & Aaronson PI. (1992). Ca^{2+} -activated and voltage-gated K^{+} currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. *J Physiol* 457, 431-454.
- Smith RD, Borisova L, Wray S & Burdyga T. (2002). Characterisation of the ionic currents in freshly isolated rat ureter smooth muscle cells: evidence for species-dependent currents. *Pflugers Arch* 445, 444-453.
- Smith WB, 2nd, McCaslin IR, Gokce A, Mandava SH, Trost L & Hellstrom WJ. (2013). PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. *Int J Clin Pract* 67, 768-780.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83, 1325-1358.
- Soucie JM, Thun MJ, Coates RJ, McClellan W & Austin H. (1994). Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States. *Kidney Int* 46, 893-899.
- Srinivasan D, Kosaka AH, Daniels DV, Ford AP & Bhattacharya A. (2004). Pharmacological and functional characterization of bradykinin B2 receptor in human prostate. *Eur J Pharmacol* 504, 155-167.
- Stankov G, Schmieder G, Zerle G, Schinzel S & Brune K. (1994). Double-blind study with dipyrrone versus tramadol and butylscopolamine in acute renal colic pain. *World J Urol* 12, 155-161.

- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB & De Miguel F. (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* 172, 1175-1178.
- Stief CG, Uckert S, Truss MC, Becker AJ, Machtens S & Jonas U. (1996). A possible role for nitric oxide in the regulation of human ureteral smooth muscle tone in vitro. *Urol Res* 24, 333-337.
- Subak LL, Pinto AM, Wing RR, Nakagawa S, Kusek JW, Herman WH & Kuppermann M. (2012). Decrease in Urinary Incontinence Management Costs in Women Enrolled in a Clinical Trial of Weight Loss to Treat Urinary Incontinence. *Obstet Gynecol* 120, 277-283.
- Sui G, Fry CH, Montgomery B, Roberts M, Wu R & Wu C. (2014). Purinergic and muscarinic modulation of ATP release from the urothelium and its paracrine actions. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F286-298.
- Swandulla D, Carbone E & Lux HD. (1991). Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity? *Trends Neurosci* 14, 46-51.
- Takeda M, Obara K, Mizusawa T, Tomita Y, Arai K, Tsutsui T, Hatano A, Takahashi K & Nomura S. (1999). Evidence for beta3-adrenoceptor subtypes in relaxation of the human urinary bladder detrusor: analysis by molecular biological and pharmacological methods. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 1367-1373.
- Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE & Stull JT. (1994). Ca(2+)-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca2+ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269, 9912-9920.
- Teague B, Asiedu S & Moore PK. (2002). The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 137, 139-145.
- Tekgul S, Riedmiller H, Hoebeke P, Kocvara R, Nijman RJ, Radmayr C, Stein R & Dogan HS. (2012). EAU guidelines on vesicoureteral reflux in children. *Eur Urol* 62, 534-542.
- Teng J, Wang ZY, Jarrard DF & Bjorling DE. (2008). Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* 15, 351-364.
- Tertyshnikova S, Matson JA, Thalody G & Lodge NJ. (2003). Partially purified *Grammostola spatulata* venom inhibits stretch activated calcium signaling in bladder myocytes and improves bladder compliance in an in vitro rat whole bladder model. *J Urol* 169, 756-760.
- Thompson WJ & Appleman MM. (1971). Cyclic nucleotide phosphodiesterase and cyclic AMP. *Ann N Y Acad Sci* 185, 36-41.
- Thor KB. (2003). Serotonin and norepinephrine involvement in efferent pathways to the urethral rhabdosphincter: implications for treating stress urinary incontinence. *Urology* 62, 3-9.
- Thorneloe KS & Nelson MT. (2003). Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K⁺ current. *J Physiol* 549, 65-74.
- Tippmer S, Quitterer U, Kolm V, Faussner A, Roscher A, Mosthaf L, Muller-Esterl W & Haring H. (1994). Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon, and zeta. *Eur J Biochem* 225, 297-304.

- Tominaga M, Wada M & Masu M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6951-6956.
- Tomiyama Y, Murakami M, Hayakawa K, Akiyama K, Yamazaki Y, Kojima M, Shibata N & Akahane M. (2003a). Pharmacological profile of KUL-7211, a selective beta-adrenoceptor agonist, in isolated ureteral smooth muscle. *J Pharmacol Sci* 92, 411-419.
- Tomiyama Y, Wanajo I, Yamazaki Y, Murakami M, Kojima M & Shibata N. (2003b). Functional muscarinic cholinceptors in the isolated canine ureter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367, 348-352.
- Traish A, Moran E, Krane RJ & Saenz de Tejada I. (1992). Endothelin in the urinary bladder. II. Characterization of endothelin receptor subtypes. *J Urol* 148, 1299-1306.
- Travaglini F, Bartoletti R, Gacci M & Rizzo M. (2004). Pathophysiology of reno-ureteral colic. *Urol Int* 72 Suppl 1, 20-23.
- Trevisani M, Schmidlin F, Tognetto M, Nijkamp FP, Gies JP, Frossard N, Amadesi S, Folkerts G & Geppetti P. (1999). Evidence for in vitro expression of B1 receptor in the mouse trachea and urinary bladder. *Br J Pharmacol* 126, 1293-1300.
- Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, Zeidel M, Stoffer D & Apodaca G. (2002). Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 13, 830-846.
- Tucci P, Evandri MG & Bolle P. (2002). Tachykinin-independent activity of capsaicin on in-vitro lamb detrusor. *J Pharm Pharmacol* 54, 1111-1115.
- Turner WH & Brading AF. (1997). Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther* 75, 77-110.
- Uckert S, Hedlund P, Andersson KE, Truss MC, Jonas U & Stief CG. (2006). Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. *Eur Urol* 50, 1194-1207; discussion 1207.
- Uckert S, Kuczyk MA & Oelke M. (2013). Phosphodiesterase inhibitors in clinical urology. *Expert Rev Clin Pharmacol* 6, 323-332.
- Uckert S, Sigl K, Waldkirch ES, Sandner P, Ulbrich E, Oelke M, Stief CG & Kuczyk MA. (2009). [Significance of phosphodiesterase isoenzymes in the control of human detrusor smooth muscle function. An immunohistochemical and functional study]. *Urologe A* 48, 764-769.
- Uckert S, Stief CG, Lietz B, Burmester M, Jonas U & Machtens SA. (2002). Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle - functional effects in vitro and immunohistochemical presence. *World J Urol* 20, 244-249.
- Van Schoor J, Joos GF & Pauwels RA. (2000). Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology and implications for clinical research. *Eur Respir J* 16, 514-533.
- Vasko MR, Campbell WB & Waite KJ. (1994). Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14, 4987-4997.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A & Vaudry H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52, 269-324.

- Vaughan ED, Jr., Shenasky JH, 2nd & Gillenwater JY. (1971). Mechanism of acute hemodynamic response to ureteral occlusion. *Invest Urol* 9, 109-118.
- Vela Navarrete R & Garcia-Fisac JM. (1983). [Complete ureteral obstruction: delayed manometric response and its physiopathologic significance]. *Arch Esp Urol* 36, 383-390.
- Verdejo Bravo C, Salinas Casado J, Virseda Chamorro M, Rexach Cano L, Adot Zurbano JM, Resel Estevez L & Ribera Casado JM. (1999). [Toward a simplified method of classifying urinary incontinence in the elderly based on a multivariate analysis of 948 cases]. *Arch Esp Urol* 52, 440-450.
- Vlasova M, Purhonen AK, Jarvelin MR, Rodilla E, Pascual J & Herzig KH. (2010). Role of adipokines in obesity-associated hypertension. *Acta Physiol (Oxf)* 200, 107-127.
- Wachtfogel YT, DeLa Cadena RA & Colman RW. (1993). Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res* 72, 1-21.
- Waldkirch E, Uckert S, Sigl K, Langnaese K, Richter K, Stief CG, Kuczyk MA & Hedlund P. (2010). Expression of cAMP-dependent protein kinase isoforms in the human prostate: functional significance and relation to PDE4. *Urology* 76, 515.e518-514.
- Wang HZ, Lee SW, Day NS & Christ GJ. (2001). Gap junction channel activity in cultured human bladder smooth muscle cell pairs: gating and unitary conductances. *Urology* 57, 111.
- Wang M, Guo Z & Wang S. (2012). Cystathionine gamma-lyase expression is regulated by exogenous hydrogen peroxide in the mammalian cells. *Gene Expr* 15, 235-241.
- Wang Y, Yang JN, Arner A, Boels PJ & Fredholm BB. (2010). Adenosine A(1) receptors and vascular reactivity. *Acta Physiol (Oxf)* 199, 211-220.
- Wardle KA, Ranson J & Sanger GJ. (1997). Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord. *Br J Pharmacol* 121, 1012-1016.
- Weaver-Osterholtz D, Reams G, Wu Z, Knaus J, Campbell F & Bauer JH. (1996). The urinary bladder angiotensin system: response to infusions of angiotensin I and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Kidney Dis* 28, 603-609.
- Weiss R, Mevissen M, Hauser DS, Scholtysik G, Portier CJ, Walter B, Studer UE & Danuser H. (2002). Inhibition of human and pig ureter motility in vitro and in vivo by the K(+) channel openers PKF 217-744b and nicorandil. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 651-658.
- Wellner MC & Isenberg G. (1993). Properties of stretch-activated channels in myocytes from the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 466, 213-227.
- Werle E & Zach P. (1970). [Distribution of kininogen in the serum and tissues of rats and other mammals]. *Z Klin Chem Klin Biochem* 8, 186-189.
- Wheeler MA, Ayyagari RR, Wheeler GL & Weiss RM. (2005). Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. *J Smooth Muscle Res* 41, 1-21.
- Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP & Westfall TD. (2003). Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 138, 757-766.
- Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J & et al. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 102, 774-777.

- Woolf AS & Davies JA. (2013). Cell biology of ureter development. *J Am Soc Nephrol* 24, 19-25.
- Wu C, Sui G & Fry CH. (2002). The role of the L-type Ca(2+) channel in refilling functional intracellular Ca(2+) stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol* 538, 357-369.
- Wuest M, Eichhorn B, Grimm MO, Wirth MP, Ravens U & Kaumann AJ. (2009). Catecholamines relax detrusor through beta 2-adrenoceptors in mouse and beta 3-adrenoceptors in man. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 213-222.
- Wulff H, Castle NA & Pardo LA. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 8, 982-1001.
- Xin W, Li N, Cheng Q & Petkov GV. (2014). BK channel-mediated relaxation of urinary bladder smooth muscle: a novel paradigm for phosphodiesterase type 4 regulation of bladder function. *J Pharmacol Exp Ther* 349, 56-65.
- Xin W, Soder RP, Cheng Q, Rovner ES & Petkov GV. (2012). Selective inhibition of phosphodiesterase 1 relaxes urinary bladder smooth muscle: role for ryanodine receptor-mediated BK channel activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C1079-1089.
- Yamaguchi O. (2013). Latest treatment for lower urinary tract dysfunction: therapeutic agents and mechanism of action. *Int J Urol* 20, 28-39.
- Yamanishi T, Chapple CR, Yasuda K, Yoshida K & Chess-Williams R. (2002). The role of beta(3)-adrenoceptors in mediating relaxation of porcine detrusor muscle. *Br J Pharmacol* 135, 129-134.
- Yang JM, Yang SH, Yang SY, Yang E & Huang WC. (2009). Reliability of real-time ultrasound to detect pelvic floor muscle contraction in urinary incontinent women. *J Urol* 182, 2392-2396.
- Yazaki J, Aikawa K, Shishido K, Yanagida T, Nomiya M, Ishibashi K, Haga N & Yamaguchi O. (2011). Alpha1-adrenoceptor antagonists improve bladder storage function through reduction of afferent activity in rats with bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn* 30, 461-467.
- Yoshikawa A, van Breemen C & Isenberg G. (1996). Buffering of plasmalemmal Ca²⁺ current by sarcoplasmic reticulum of guinea pig urinary bladder myocytes. *Am J Physiol* 271, C833-841.
- Yoshimura N & Chancellor MB. (2003). Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. *Rev Urol* 5 Suppl 8, S3-s10.
- Yoshimura N, Kaiho Y, Miyazato M, Yunoki T, Tai C, Chancellor MB & Tyagi P. (2008). Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 437-448.
- Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB & Tyagi P. (2014). Neural Mechanisms Underlying Lower Urinary Tract Dysfunction. *Korean J Urol* 55, 81-90.
- Yoshiyama M & de Groat WC. (2008). The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract. *J Mol Neurosci* 36, 227-240.
- Yu W, Hill WG, Apodaca G & Zeidel ML. (2011). Expression and distribution of transient receptor potential (TRP) channels in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F49-59.
- Yu W, Zacharia LC, Jackson EK & Apodaca G. (2006). Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C254-265.

Zagorodnyuk VP, Gregory S, Costa M, Brookes SJ, Tramontana M, Giuliani S & Maggi CA. (2009). Spontaneous release of acetylcholine from autonomic nerves in the bladder. *Br J Pharmacol* 157, 607-619.

Zahradnik I, Gyorke S & Zahradnikova A. (2005). Calcium activation of ryanodine receptor channels--reconciling RyR gating models with tetrameric channel structure. *J Gen Physiol* 126, 515-527.

Zhao H, Liang X, Zhong H, Zhang CJ & He F. (2013). [Involvement of store-operated calcium channels and receptor-operated calcium channels in Ca^{2+} -sensing receptor-evoked extracellular Ca^{2+} influx and NO generation in human umbilical vein endothelial cells]. *Sheng Li Xue Bao* 65, 553-561.

Zhao W, Ndisang JF & Wang R. (2003). Modulation of endogenous production of H_2S in rat tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 848-853.

Zuraw BL, Sugimoto S, Parsons CL, Hugli T, Lotz M & Koziol J. (1994). Activation of urinary kallikrein in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 152, 874-878.

8. ABSTRACT

ROLE OF THE BRADYKININ AND THE PHOSPHODIESTERASE TYPE 4 INHIBITORS IN THE PHYSIOLOGY OF MICTURITION

INTRODUCTION

Bradykinin (BK), a metabolite of the kallikrein-kinin system, is a potent mediator of inflammation, causing pain, vasodilatation, increased vascular permeability, fluid secretion from epithelia and smooth muscle contraction (Dray & Perkins, 1993). BK exerts its action via two receptor subtypes B_1 and B_2 (Regoli et al., 1998). BK is a selective agonist for the B_2 receptor, whereas the B_1 one exhibits greater selectivity for BK metabolites lacking the C-terminal Arg (Regoli et al., 1998). BK immunoreactivity is present in afferent and autonomic efferent neurons innervating the bladder and urethra smooth muscle and in the urothelium, where BK exerts a wide range of biological actions including the ability to contract, via B_1 and B_2 receptor activation, the detrusor smooth muscle, stimulate sensory nerves and evoke the release of cyclooxygenase (COX) products (Meini et al., 1998, 2000; Arms & Vizzard, 2011; Andersson & Arner, 2004). Both BK receptor subtypes also play a key role in the pathogenesis of experimental cystitis and activation of the kallikrein-kinin system in urinary bladders of patients suffering interstitial cystitis has been reported (Zuraw et al., 1994; Lecci et al., 1999). BK receptors have also been proposed as therapeutic receptor targets for the stress urinary incontinence, by increasing the outlet resistance (Yoshimura et al., 2008).

Phosphodiesterases (PDEs) are essential components in the cyclic AMP (cAMP)/protein kinase A (PKA) and the cyclic GMP (cGMP)/protein kinase G (PKG) signaling pathways since they can hydrolyze, within the cell, ten times more cAMP and/or cGMP than they are synthesized by their respective cyclases. PDEs inhibition results in large increases in intracellular cAMP and/or cGMP concentrations and subsequent kinase activation, thus enhancing smooth muscle relaxation (Matsumoto et al., 2003; Wheeler et al., 2005). There are 11 known PDE isoenzymes of which the PDE4, PDE7 and PDE8 families specifically hydrolyze cAMP, whereas that PDE5, PDE6 and PDE9 are cGMP-specific. PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 and PDE11 are dual substrate PDEs (Matsumoto et al., 2003; Wheeler et al., 2005).

The cAMP signaling pathway is essential in the regulation of bladder contractility (Wheeler et al., 2005; Petkov & Nelson, 2005; Hristov et al., 2008). cAMP, via PKA activation, regulates smooth muscle function by targeting the activity of

various K^+ and Ca^{2+} channels, thus reducing the myocyte excitability and contractility (Petkov & Nelson, 2005; Hristov et al., 2008). The cAMP and cGMP pathways have a major role in detrusor and urethra, respectively, relaxation, and thus PDE4 and PDE5 inhibitors have been proposed for the treatment of overactive bladder and lower urinary tract symptoms (LUTS), respectively (Andersson, 2007; Oger et al., 2007; Hristov et al., 2008; Yamaguchi, 2013).

The autonomic nervous system plays an essential role in the maintenance of ureteral motor activity. Thus, noradrenaline (NA) (Hernández et al., 1992) and acetylcholine (Hernández et al., 1993) stimulate intravesical ureter phasic activity and basal tone through adrenergic and muscarinic, respectively, receptors. Nitric oxide (NO) and unknown nature mediator/s are involved in the non-adrenergic non-cholinergic (NANC) inhibitory neurotransmission of the pig intravesical ureter (Hernández et al., 1995). Several peptides exert a dual action (contraction and/or relaxation) of the intravesical ureter smooth muscle. Thus, substance P or neurokinin A evoke a direct contraction through smooth muscle NK_2 receptors (Bustamante et al., 2000, 2001), whereas vasoactive intestinal peptide (VIP) or pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP 38) relax the intravesical ureter through smooth muscle VIP/PACAP receptors (Hernández et al., 2004).

The bladder neck is part of the urine bladder outflow region, in which NO (Hernández et al., 2007, 2008) and several non NO mediators, such as PACAP 38 (Hernández et al., 2006), calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Martínez-Sáenz et al., 2011) and hydrogen sulfide (H_2S) (Fernandes et al., 2013a, 2013b), as well as an unidentified nerve-dependent component (Martínez-Sáenz et al., 2011), are involved in the inhibitory transmission.

The knowledge of the mechanisms involved in the control of the intravesical ureter and/or bladder neck smooth muscle tone is essential in order to provide therapeutical agents for contraction and/or relaxation of distal ureter in vesicoureteral reflux and obstructive ureteral pathologies, as well as, for the treatment of urinary incontinence produced by intrinsic sphincteric deficiency (Hernández et al., 2008) and for relax the bladder outlet region in LUTS secondary to benign prostatic hyperplasia (BPH) (Nishiguchi et al., 2007; Fernandes et al., 2012; Rahnama'i et al., 2013).

AIMS

There are no data about the involvement of BK receptors in distal ureter and bladder outflow region tone regulation, as well as, about the role of PDE4 in the bladder base smooth muscle relaxation. Therefore, the current study investigates the role of BK receptors on the pig intravesical ureter and bladder neck smooth muscle contractility and the PDE4 expression and the relaxation elicited by the PDE4 inhibitor rolipram in the pig and human bladder neck.

METHODS

We used immunohistochemistry for BK receptor and PDE4 expression, myographs for isometric force recordings to BK and rolipram, and fura-2 fluorescence for simultaneous measurements of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and tension for rolipram in bladder neck samples.

RESULTS

Concerning to the role of BK receptors in the regulation of the smooth muscle contractility of the pig intravesical ureter, our results provide morphological and functional evidence for an involvement of neuronal and smooth muscle B_2 receptors in the regulation of muscle tension to the pig intravesical ureter. BK produces contraction via activation of smooth muscle B_2 receptors essentially coupled to extracellular Ca^{2+} entry via L-type VOC channels with a poor role for intracellular Ca^{2+} mobilization. In addition, neuronal B_2 receptors facilitating the NO-dependent and independent NANC inhibitory neurotransmission are also involved. This conclusion is supported by the following observations: (i) The presence of the B_2 receptor in the smooth muscle and urothelium, as well as B_2 receptor-IR detected within nerve fibers widely distributed in the muscle layer of the intravesical ureter. (ii) BK-induced contraction was profoundly reduced as a consequence of extracellular Ca^{2+} removal and by B_2 receptor and L-type VOC channel blockade. (iii) On U46619-precontracted samples, under NANC conditions, in the absence or presence of NO synthase inhibitors, electrical field stimulation (EFS)-elicited frequency-dependent relaxations which were reduced by B_2 receptor blockade. (iv) Kallidin, a B_1 receptor agonist, failed to increase preparation basal tension or to induce relaxation on U46619-induced tone.

In the bladder neck, current results provide morphological and functional evidence that neuronal and non-neuronal mechanisms are involved in the BK-induced effect on tension of the pig bladder neck. BK produces contraction via activation of

smooth muscle kinin B₂ receptors essentially coupled to extracellular Ca²⁺ entry via VOC (L-type). Neuronal facilitatory B₂ receptors modulating NANC inhibitory neurotransmission and urothelial B₁ receptors producing smooth muscle relaxation via COX-1 pathway and BK_{Ca} channel activation are also demonstrated. This is supported by the following data: (i) The presence of the B₂ receptor in the smooth muscle and urothelium, as well as B₂ receptor-IR detected within nerve fibers widely distributed in the muscle layer of the bladder neck. (ii) BK-induced contraction was profoundly reduced as a consequence of extracellular Ca²⁺ removal and by B₂ receptor and L-type VOC channel blockade. (iii) On phenylephrine-precontracted denuded strips, under NANC conditions, in the absence or presence of NO synthase inhibitors, EFS-elicited frequency-dependent relaxations which were reduced by B₂ receptor blockade. (iv) In urothelium-intact samples, the B₁ receptor agonist kallidin promoted concentration-dependent relaxations which were reduced by blockade of B₁ receptors, COX, COX-1 and BK_{Ca} channels and abolished in urothelium-denuded samples and in K⁺-enriched physiological saline solution (KPSS)-precontracted strips.

Moreover, current results show the presence of PDE4 enzyme in the smooth muscle layer of the pig and human bladder neck, where rolipram, a PDE4 inhibitor, exerts a much more potent relaxation than that elicited by PDE5 inhibitors sildenafil and vardenafil. This is supported by the following findings: (i) PDE4 expression was observed widely distributed in the smooth muscle layer of the pig and human bladder neck. (ii) On urothelium-denuded phenylephrine (PhE)-precontracted strips of pig and human, rolipram, sildenafil and vardenafil produced concentration-dependent relaxations with the following order of potency: rolipram>>sildenafil>vardeafil. (iii) In pig, the adenylyl cyclase activator forskolin potentiated rolipram-elicited relaxation, whereas PKA blockade reduced such effect. On KPSS-precontracted bladder neck strips, rolipram evoked a lower relaxation than that obtained on PhE-stimulated preparations. Inhibition of large BK_{Ca} and IK_{Ca} channels, neuronal VOC channels, NO and H₂S synthases reduced rolipram responses. (iv) Rolipram inhibited the contractions induced by PhE without reducing the PhE-evoked [Ca²⁺]_i increase.

CONCLUSIONS

From all of our results we can conclude:

1. BK produces contraction of pig intravesical ureter via smooth muscle B₂ receptors coupled to extracellular Ca²⁺ entry mainly via VOC (L-type) channels, with a poor role for intracellular Ca²⁺ mobilization. Facilitatory neuronal B₂ receptors modulating NO-dependent or independent NANC inhibitory neurotransmission are also demonstrated. (Ribeiro et al., Under Review in *Neurourol Urodyn*).
2. The fact that B₂ receptors are involved in the potent BK-induced contraction in the intravesical ureter, suggests a possible use of selective agonists of these receptors to cause contraction and the closure of the distal ureter in vesicoureteral reflux. B₂ receptor antagonists and inhibitors of L-type VOC channels, could be also therapeutically useful as antispasmodics in obstructive processes for producing smooth muscle relaxation and favour the progression of calculi embedded in the ureteral wall.
3. BK produces contraction of pig bladder neck via smooth muscle B₂ receptors coupled mainly to extracellular Ca²⁺ entry via VOC channels with a minor role for intracellular Ca²⁺ mobilization. Facilitatory neuronal B₂ receptors modulating NANC inhibitory neurotransmission and urothelial B₁ receptors producing relaxation via the COX-1 pathway and BK_{Ca} channel opening are also demonstrated (Ribeiro et al., 2013).
4. PDE4 is present in the pig and human bladder neck smooth muscle, where rolipram exerts a much more potent relaxation than that elicited by PDE5 inhibitors, sildenafil and vardenafil. In pig, rolipram-induced response is produced through the PKA pathway involving BK_{Ca} and IK_{Ca} channel activation and [Ca²⁺]_i desensitization-dependent mechanisms, this relaxation also being due to neuronal NO and H₂S release (Ribeiro et al., 2014).
5. B₂ receptor selective agonists may be of therapeutic use in urinary stress incontinence caused by intrinsic sphincteric deficiency for producing contraction and closure of the internal urethral sphincter. Furthermore, antagonists of these receptors and L-type VOC channels and PDE4 inhibitors may be effective in treating LUTS secondary to BPH.

